

**Die Auslösung von Semigamie und aberranter
Embryogenese nach der Einwirkung weicher
Röntgenstrahlen auf unbefruchtete Eizellen von
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von

Doris Gerlach

aus
Stuttgart

Pergamon Press London, 1969
VEB Georg Thieme Leipzig, 1970

1968

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 27. 11. 1968

Dekan: Professor Dr. H. Wegener
Erstberichterstatter: Professor Dr. C.-G. Arnold
Zweitberichterstatter: Professor Dr. E. Haustein

Sonderdruck aus: Radiation Botany, Band 9
Biologisches Zentralblatt, Band 89, Heft 4

EMBRYO- UND ENDOSPERMENTWICKLUNG NACH EINER RÖNTGENBESTRAHLUNG DER FRUCHTKNOTEN VON *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

DORIS GERLACH-CRUSE

Botanisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland

(Received 5 May 1969)

Zusammenfassung—Nach einer Bestrahlung der Fruchtknoten von *Arabidopsis thaliana* mit Röntgenstrahlen (56 kV, 2 mA, Filter 0,1 mm Al) und anschließender Bestäubung der Narben mit unbestrahltem Pollen werden neben einer normalen Befruchtung folgende Abweichungen beobachtet. Einerseits kann die Karyogamie zwischen ♀ und ♂ Kern unterbleiben, andererseits kann eine di- oder trisperme Befruchtung der Eizellen erfolgen. Im Gegensatz zu den Kontrollen sind die Embryonen in den Samenanlagen der bestrahlten Fruchtknoten unterschiedlich weit entwickelt. Die Variationsbreite ist 8 Tage nach der Bestäubung am grössten. Mit steigender Dosis nimmt die Anzahl der sich entwickelnden Embryonen ab. Degenerationen werden erst sichtbar, wenn im Embryo und Endosperm einige Teilungen erfolgt sind. Dabei degenerieren die Zellen des eigentlichen Embryokörpers früher und häufiger als die des Suspensors. Zahlreiche Embryonen entwickeln sich nur bis zum kugelförmigen Stadium. Die Embryoentwicklung ist bis zum frühen kugelförmigen Stadium von der Endospermentwicklung unabhängig.

Ab dem 4. Tag nach der Bestäubung werden im Suspensor aberrante Teilungen festgestellt. Durch vermehrte Teilungen senkrecht zur Längsachse des Embryos ist die Zahl der Suspensorzellen häufig abnorm vermehrt. Weitere parallel zur Längsachse orientierte Teilungen führen zu flächigen oder massigen Suspensoren. Betreffen die Teilungen nur einige Zellen des Suspensors, so gleichen diese Teilungsprodukte häufig Embryonen im Quadrantenstadium.

Die Anzahl der Endospermkerne ist nach der Fruchtknotenbestrahlung geringer als bei den Kontrollen. Nach hohen Dosen treten Degenerationen im Endosperm eher auf als nach niederen Dosen.

Abstract—After X-ray irradiation (56 kV, 2 mA, filter 0.1 mm Al) of the pistils in *Arabidopsis thaliana* and subsequent pollination of the stigmata with non-irradiated pollen, the following aberrations can be observed, except for normal fertilization: on the one hand, the caryogamy between female and male nucleus may be inhibited, on the other, dispermous or trispermous fertilization of the ova may take place. Compared to the controls, the embryos of the ovules show different stages of development after irradiation of the pistils. The widest range of variation was observed eight days after pollination. With increasing dose the number of embryos developing decreases. Degenerations are only detectable after several divisions of embryo and endosperm; the cells of the embryo proper degenerate earlier and more often than those of the suspensor. Numerous embryos develop only into the globular stage. Up to the early globular stage the development of the embryo is independent of that of the endosperm.

From the fourth day after pollination aberrant divisions can be observed in the suspensor. An increase in divisions running vertically to the longitudinal axis of the embryo often results in an abnormally increased number of suspensor cells. Additional divisions running parallel to the longitudinal axis lead to flattened or bulky suspensors. If only a few cells of the suspensors

are involved in these divisions, the division products will often be similar to embryos in the quadrant stage.

Compared to the controls, the number of endosperm nuclei is reduced after irradiation of the pistils. Degeneration of the endosperm is more like to occur with high doses than with low doses.

Résumé—Après irradiation aux rayons X (56 kV, 2 mA, filtre 0,1 mm Al) d'ovules d'*Arabidopsis thaliana* et pollinisation des parties atteintes avec du pollen non irradié, on a observé en même temps qu'une fructification normale les anomalies suivantes. D'une part, la caryogamie entre noyaux ♀ et ♂ peut cesser. D'autre part, une fructification à partir d'une fécondation di- ou trisperme de la cellule oeuf peut se produire.

Contrairement aux embryons témoins, ceux des ovules irradiés, se développent distinctement jusqu' à un stade avancé dans la graine. L'amplitude de variation est au plus 8 jours après pollinisation. Le nombre d'embryons qui se développent, diminue lorsque la dose croît. La dégénérescence est d'abord visible lorsque quelques divisions surviennent dans l'embryon et l'endosperme. Alors, les cellules des parties embryonnaires proprement dites dégénèrent avant et plus fréquemment que les suspenseurs. Des embryons nombreux se développent uniquement jusqu'au stade sphérique. Le développement de l'embryon est jusqu'au stade sphérique indépendant du développement de l'endosperme. Des divisions aberrantes apparaissent dans le suspenseur le 4ème jour après pollinisation.

Le nombre de cellules du suspenseur se développe souvent anormalement à partir de divisions verticales par rapport au grand axe de l'embryon. Des divisions ultérieures orientées parallèlement par rapport au grand axe produisent des suspenseurs aplatis ou volumineux. Si les divisions ne concernent que quelques cellules du suspenseurs, les produits des divisions ressemblent alors fréquemment à des embryons au stade quadrant. Après irradiation des ovules, le nombre de noyaux de l'endosperme est plus réduit que chez les témoins.

Après des doses plus élevées, la dégénérescence embryonnaire se produit antérieurement.

EINLEITUNG

IE EINWIRKUNG ionisierender Strahlen auf die Embryogenese höherer Pflanzen wurde bereits mehrfach untersucht.^(4,5,8,14,16,22) Die Untersuchungen erstreckten sich auf die Embryoentwicklung sowohl nach einer Pollenbestrahlung als auch nach Bestrahlung beider Gameten sowie nach Bestrahlung der verschiedenen Stadien der Embryogenese. Am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* sollte nun untersucht werden, welche Veränderungen eintreten, wenn allein die Fruchtknoten, nicht jedoch die Pollenbestrahlung werden. Dabei sollte besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, in welchem Umfang die Befruchtung sowie die Entwicklung von Embryo und Endosperm beeinflusst werden.

MATERIAL UND METHODEN

Als Objekt war die von Reinholz⁽¹⁵⁾ beschriebene Enkheimer Rasse der Crucifere *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. besonders geeignet.

Aufzucht

Die Keimung der Samen erfolgte in Petrischalen auf angefeuchtetem Filtrierpapier. Sobald sich die Cotyledonen entfaltet hatten, wurden die Keimlinge in sterilisierte Komposterde pikiert. Die Aufzucht erfolgte unter Gewächshausbedingungen. Zur Röntgenbestrahlung wurden die Pflanzen im Rosettenstadium einzeln in Töpfe von 7 cm Durchmesser gepflanzt. Vom Herbst bis zum zeitigen Frühjahr wurde Zusatzlicht gegeben.

Bestrahlungsbedingungen

Beim Kastrieren der Blütenknospen wurden ausser den Antheren auch die Kelch- und Blütenblätter entfernt. Vorversuche ergaben, dass diese Behandlung die weitere Entwicklung nicht beeinträchtigte. Um eine genaue Orientierung der Pflanzen zur Strahlenquelle zu ermöglichen, war es zweckmässig, die Pflanzen einzeln zu bestrahlen. Die Ausrichtung der zwei Fruchtknoten, die pro Pflanze bestrahlt wurden,

folgte so, dass sie beide den gleichen Abstand zur Strahlenquelle einnahmen. Die Bestrahlungen erfolgten mit einer Dermopan-Röhre (66 kV, 2 mA, FHA 10 cm, Filter 0,1 mm Al). Die Dosisleistung betrug 2000 R/min. (Dosismessung mit einer Phantomkammer am Siemens Universaldosimeter). Die Bestrahlungen wurden im August und September 1965 im Institut für Medizinische Strahlenkunde der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

Histologische Untersuchungen

Bestrahlte und unbestrahlte Fruchtknoten wurden nach Fixierung in Alkohol-Eisessig (3 : 1) über Chloroform in Paraffin eingebettet. Die Färbung der 10 μ dicken Schnitte erfolgte mit Eisentrioxyhämatein nach Hansen (Romeis).⁽¹⁷⁾

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Entwicklung der Kontrollen

Die Embryoentwicklung von *Arabidopsis thaliana* folgt dem Capsella-Typ (Reinholz).⁽¹⁸⁾ Unter den Erlanger Gewächshausbedingungen hat sich der befruchtete sekundäre Embryosackkern einen Tag nach der Bestäubung meistens 1 bis 2 mal geteilt, während der Eizellkern zu dieser Zeit normalerweise die Karyogamie mit dem ♂ Kern vollzieht. Unter ungünstigen Bedingungen, zum Beispiel bei niedrigerer Temperatur (ca. 14–18°C) kann die Entwicklung etwas langsamer ablaufen, so dass noch kein Endosperm vorhanden ist, der

sekundäre Embryosackkern aber befruchtet ist. Unter Normalbedingungen ist 2 Tage nach der Bestäubung die Embryoentwicklung bis zum 2- oder 4-Zellstadium fortgeschritten bei niedriger bzw. höherer Temperatur werden 1-zellige bzw. 8-zellige Embryonen vorgefunden. Nach 4 Tagen ist bei der weitaus grössten Anzahl der Embryonen bereits das Dermatogabestadium abgegliedert. 6 Tage nach der Bestäubung werden die Cotyledonen sichtbar (Herbststadium). Nach weiteren 2 Tagen, also 8 Tage nach der Bestäubung, haben sich die Cotyledonen weiter differenziert. Innerhalb eines Fruchtknotens sind die Embryonen praktisch auf dem selben Entwicklungsstadium.

2. Embryoentwicklung nach Fruchtknotenbestrahlung

Die Bestäubung der mit 1, 2, 4, 8 und 12 kR bestrahlten Fruchtknoten erfolgte mit unbestrahltem Pollen bei einem Teil der Pflanze ca. 6 Stunden (Frühbestäubung), beim anderen Teil ca. 24 Stunden (Spätbestäubung) nach der Bestrahlung. 1, 2, 4, 6 und 8 Tage nach der Bestäubung wurden die Fruchtknoten fixiert. Zusätzlich wurden 6 und 24 Stunden nach der Bestrahlung Fruchtknoten fixiert, deren Narben nicht bestäubt waren. Die Anzahl der bestrahlten Pflanzen betrug 584. Nachdem unter den angegebenen Bedingungen zwei Blüten pro Tag aufblühen, und jeder Fruchtknoten ca. 5 Samenanlagen enthält, wurden insgesamt ca. 58 400 Samenanlagen bestrahlt. Die Zuordnung zu den einzelnen Serien ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1. Anzahl der bestrahlten Pflanzen

Serien	1 kR	2 kR	4 kR	8 kR	12 kR
6 Std. nach d. Bestrahlung	10	10	10	10	10
24 Std. nach d. Bestrahlung	10	10	10	10	10
1 Tag nach d. Bestäubung (F)	10	10	10	10	10
1 Tag nach d. Bestäubung (S)	10	10	10	10	10
2 Tage nach d. Bestäubung (F)	14	19	19	22	18
2 Tage nach d. Bestäubung (S)	12	12	13	12	12
4 Tage nach d. Bestäubung (F)	12	11	15	21	16
4 Tage nach d. Bestäubung (S)	10	11	10	10	10
6 Tage nach d. Bestäubung (F)	7	4	4	4	4
6 Tage nach d. Bestäubung (S)	4	4	4	4	4
8 Tage nach d. Bestäubung (F)	5	5	5	5	5
8 Tage nach d. Bestäubung (S)	6	7	8	9	7

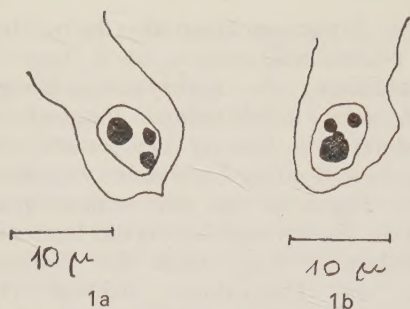


Abb. 1a. Disperme Befruchtung einer haploiden Zelle nach Bestrahlung des Fruchtknotens mit 2 kR.
Abb. 1b. Trisperme Befruchtung einer haploiden Zelle nach Bestrahlung des Fruchtknotens mit 12 kR.

Die Befruchtung der bestrahlten Eizellen ist selbst nach den höchsten Strahlendosen noch möglich und verläuft meistens normal. Gelegentlich kann eine disperme oder trisperme Befruchtung der Eizellen beobachtet werden (Abb. 1a, 1b), die bei anderen Arten auch spontan vorkommen kann (Tischler).⁽²¹⁾ Vereinzelt wird die Fusion zwischen dem Eizellkern und dem Polmakern verhindert und eine Teilung der haploiden nicht verschmolzenen Kerne induziert—mitgamie (Gerlach-Cruse).⁽⁶⁾

(a) 2 Tage nach der Bestäubung können vereinzelt noch Befruchtungsstadien gefunden werden. In geringerer Masse nach 2 kR, besonders ausgeprägt nach 8 kR und 12 kR, verzögert sich die Embryoentwicklung teilweise. Dabei sind die Embryonen eines Fruchtknotens, im Gegensatz zu den Kontrollen, auf unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Anzahl der sich entwickelnden Embryonen eines Fruchtknotens nimmt mit steigender Dosis ab. In seltenen Fällen degenerieren einzelne Zellen des Embryos.

(b) 4 Tage nach der Bestäubung: Nach einer Bestrahlung mit 2 kR ist im Gegensatz zu den Kontrollen nicht bei allen Embryonen ein Dermatogen vorhanden. Mit steigender Dosis nimmt die Anzahl der Embryonen mit abgegliedertem Dermatogen weiter ab, so dass nach 12 kR ausschließlich Embryonen ohne Dermatogen vorhanden sind. Gelegentlich sind einzelne Zellen des Embryos oder alle Deszenten der Apikalzelle degeneriert (Abb. 2), während der Suspensor erst dann Schäden

aufweist, wenn im eigentlichen Embryokörper degenerierte Zellen vorhanden sind (Abb. 3). Über die hier beginnende aberrante Embryoentwicklung siehe Seite p. 43 ff.

(c) 6 Tage nach der Bestäubung: Nach 4 kR ist das zu diesem Zeitpunkt bei den Kontrollen ausgebildete Herzstadium nur selten, nach 8 und 12 kR überhaupt noch nicht entwickelt. Teilweise fehlt sogar nach der Bestrahlung mit 8 und 12 kR ein Dermatogen.

(d) 8 Tage nach der Bestäubung: Auch hier zeigt sich mit zunehmender Dosis eine Verzögerung der Embryonalentwicklung. Während nach einer Bestrahlung mit 2 kR die Entwicklungsstadien der Embryonen nur wenig von den Kontrollen abweichen, sind bei den höheren Dosen grosse Unterschiede vorhanden. Beispielsweise sind nach einer Bestrahlung mit 4, 8 und 12 kR häufig noch keine Cotyledonen entwickelt. Mit steigender Dosis nimmt auch hier die Anzahl derjenigen Stadien, welche den Kontrollen entsprechen, ab. Das kugelförmige Stadium, das den Übergang vom radiärsymmetrischen zum bilateralsymmetrischen Stadium bildet, ist vorherrschend. Der Übergang vom radiärsymmetrischen zum bilateralsymmetrischen Stadium ist demnach eine besonders kritische Entwicklungsphase.

Nach einer Spätbestäubung entwickeln sich sowohl bei den bestrahlten Fruchtknoten als auch bei den Kontrollen weniger Samenanlagen als nach Frühbestäubung.

3. Endospermentwicklung nach Fruchtknotenbestrahlung

Während einen Tag nach der Bestäubung in den Samenanlagen der mit 1 und 2 kR bestrahlten Fruchtknoten die Endospermentwicklung nicht von den Kontrollen zu unterscheiden ist, ist die Zahl der Endospermkerne nach einer Bestrahlung mit 4–12 kR geringer. Degenerationen im Endosperm, wie zum Beispiel vakuolisierte Nukleolen, Karyolyse der Endospermkerne, sehr dichtes Cytoplasma, treten 2 Tage nach der Bestäubung vereinzelt nach 8 kR, in stärkerer Masse nach 12 kR auf. 4 Tage nach der Bestäubung können die gleichen Degenerationen im Endosperm auch schon nach 2 und 4 kR festgestellt werden. Auch wenn die Endosperme nur 2-kernig sind und



ABB. 2. 4 Tage nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 8 kR sind alle Deszendenten der Apikalzelle degeneriert, während in den Suspensorzellen keine Schäden beobachtet werden können.

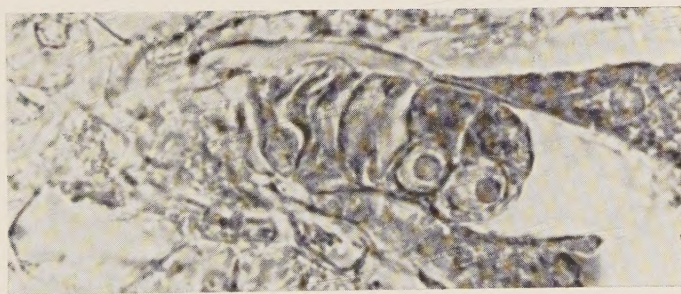


ABB. 3. 4 Tage nach der Bestäubung (F) nach Bestrahlung mit 8 kR. Die rechte Seite des Embryokörpers ist degeneriert. Im Suspensor können die ersten Schäden festgestellt werden.

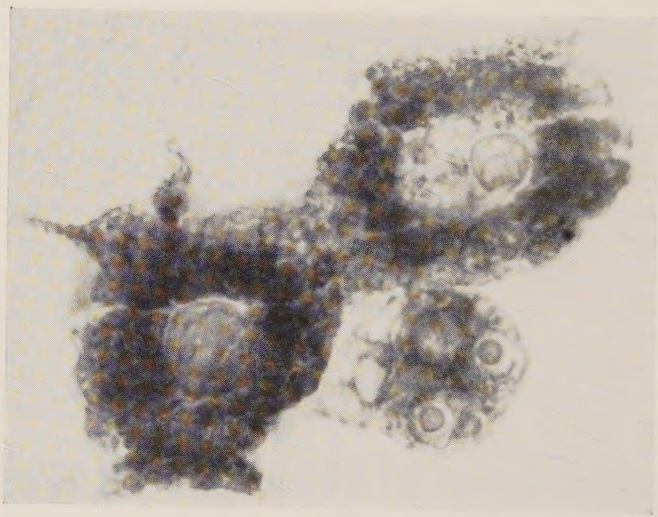


ABB. 4. 4 Tage nach der Bestäubung (F) nach Bestrahlung mit 8 kR. Der Embryo befindet sich auf dem Köpfchenstadium. Der befruchtete sekundäre Embryosackkern hat sich erst einmal geteilt. Seine Tochterkerne zeigen deutliche Degenerationserscheinungen.



ABB. 9. 8 Tage nach der Bestäubung (F) nach der Bestrahlung mit 12 kR. Der eigentliche Embryo befindet sich in Degeneration. In der Mitte des Suspensors Ausbildung eines embryoähnlichen Gebildes.

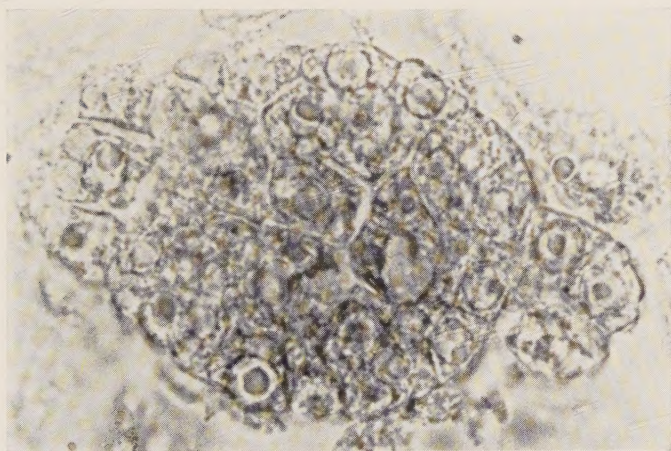


ABB. 11. 8 Tage nach der Bestäubung (S) nach einer Bestrahlung mit 12 kR. Aus einer nicht weiter differenzierten Embryonanlage entwickelt sich ein embryoähnliches Gebilde.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546214_0001

erhebliche Degenerationen zeigen, kann sich der Embryo bis zum kugelförmigen Stadium weiterentwickeln (Abb. 4). Niemals werden jedoch differenzierte Embryonen in einem degenerierten Endosperm beobachtet.

h. *Aberrante Embryogenese*

Arabidopsis thaliana bildet normalerweise einen röhrenförmigen Suspensor aus, der aus einer Zellreihe besteht (Abb. 5). Die Zellwände im Suspensor sind immer senkrecht zur Längsachse des Embryos orientiert. 4–8 Tage nach der Bestäubung können auch Embryonen beobachtet werden, in deren Suspensoren die Zellwände nicht nur senkrecht, sondern auch parallel zur Längsachse des Embryos eingezogen werden (Abb. 6a, 6b). Dies führt dann einerseits zu flächigen Suspensoren, die aus 2–3 Zellreihen aufgebaut sind, andererseits zu mehr massigen, säulenförmigen Suspensoren (Definition nach Schnarf).⁽¹⁹⁾ Die Zellen dieser Suspensoren sind umso kleiner, je öfter sich die Suspensorzellen geteilt haben. Wenn sich die Suspensorzellen, die normalerweise grösser sind und ein weniger dichtes Cytoplasma als die kleineren plasma-reichen Zellen des eigentlichen Embryos besitzen, in abnormer Weise teilen, wird auch in diesen kleineren Suspensorzellen ein dichteres Cytoplasma beobachtet.

Die mehrreihigen oder massigen Partien können sich entweder über die gesamte Länge oder aber nur auf bestimmte Abschnitte des Suspensors erstrecken. Die aus mehreren Zellreihen aufgebauten flächigen und säulenförmigen Suspensorabschnitte treten weitaus häufiger am apikalen Teil des Suspensors, der sich direkt dem Embryokörper an-

schliesst, auf. In diesem Fall ist der eigentliche Embryokörper nicht mehr deutlich vom Suspensor abgesetzt, und die Suspensorzellen des apikalen Bereichs können nicht mehr von den Zellen des Embryos im engeren Sinne unterschieden werden (Abb. 7). Der eigentliche Embryokörper lässt sich hier vom Suspensor nicht mehr an Hand des Zellbaus sondern nur noch durch die topographische Lage der Zellen abgrenzen.

Seltener ist im Anschluss an den eigentlichen Embryokörper der Suspensor zunächst aus einer Zellreihe aufgebaut, und geht ungefähr in der Mitte in einen aus mehreren Zellreihen bestehenden Suspensor über, der entweder flächig oder säulenförmig gebaut sein kann. Die säulenförmigen Ausbildungen der Suspensorabschnitte sehen häufig einem Embryo im Quadrantenstadium sehr ähnlich (Abb. 8). Wie Abb. 9 zeigt, kann auch der Suspensor eines vollkommen degenerierten Embryokörpers solche aberranten Teilungen aufweisen. An den degenerierten Embryo schliessen sich hier einige Zellen eines normal ausgebildeten Suspensors, darauf folgt ein 2 Zellen breites und ein 2 Zellen hohes embryoähnliches Gebilde, dem sich wieder ein normal ausgebildeter Suspensor anschliesst.

Auch in den mikropylar gelegenen Suspensorzellen kann es zu zusätzlichen Teilungen kommen; die Teilungsprodukte gleichen auch hier einer frühen Embryoanlage (Abb. 10). Aber nicht nur aus dem Suspensor sondern auch aus dem Embryokörper kann sich ein embryoähnliches Gebilde entwickeln (Abb. 11). Diese aberranten Teilungen sind jedoch seltener als im Suspensor. Derartige Bildungen werden

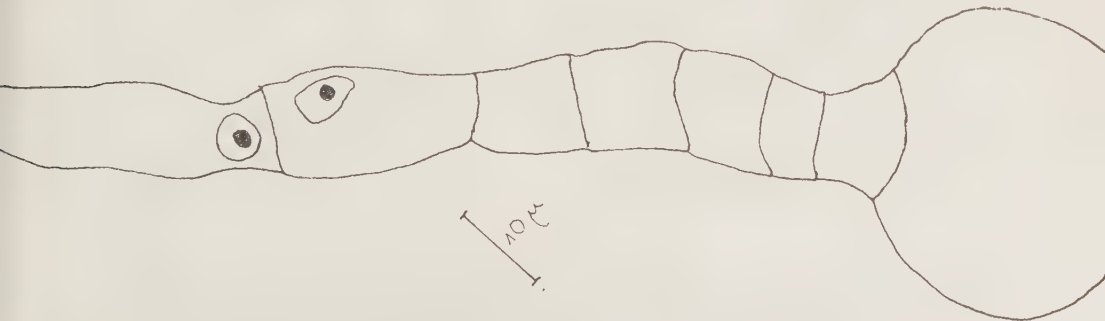
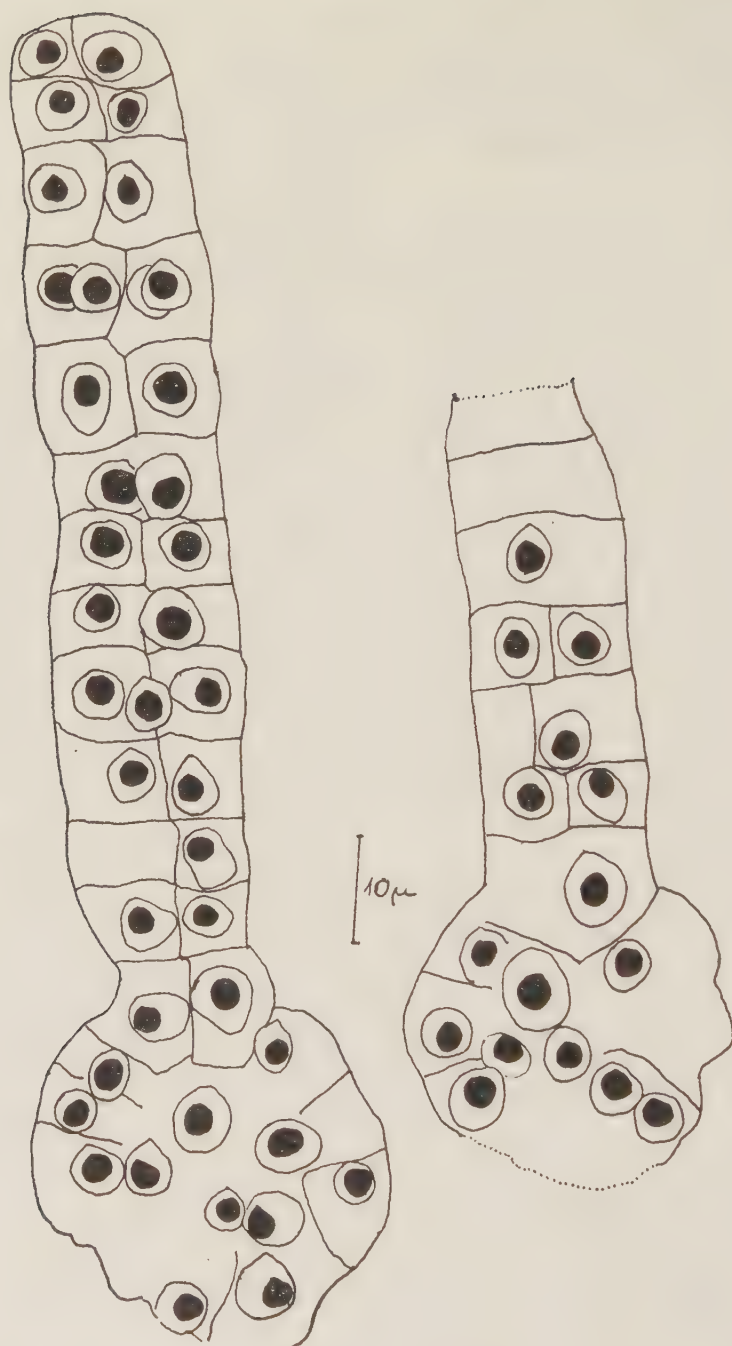


ABB. 5. Embryo im Köpfchenstadium 4 Tage nach der Bestäubung (S). Kontrolle.



6a

ABB. 6a. Embryo 8 Tage nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 12 kR.
Massiger und verlängerter Suspensor. Noch keine Differenzierung.

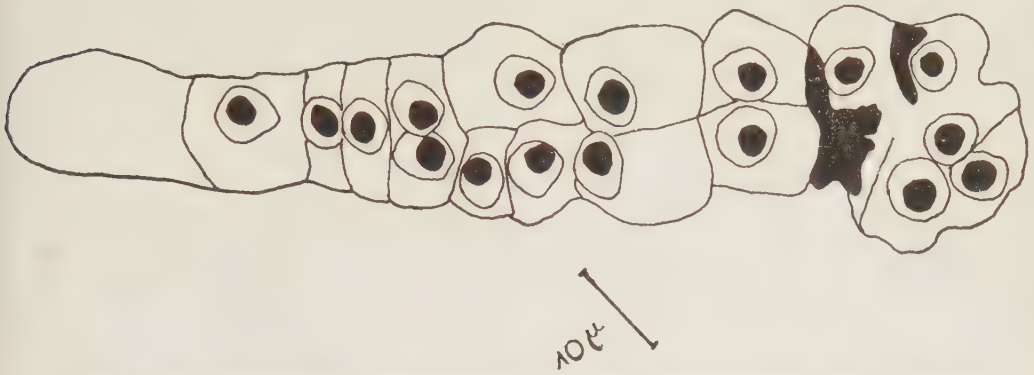


ABB. 6b. Embryo 8 Tage nach der Bestäubung (F) nach Bestrahlung mit 12 kR. Massiger Suspensor. Degenerationen im Embryo (Karyolyse, gewellte Umrisse des Embryos).

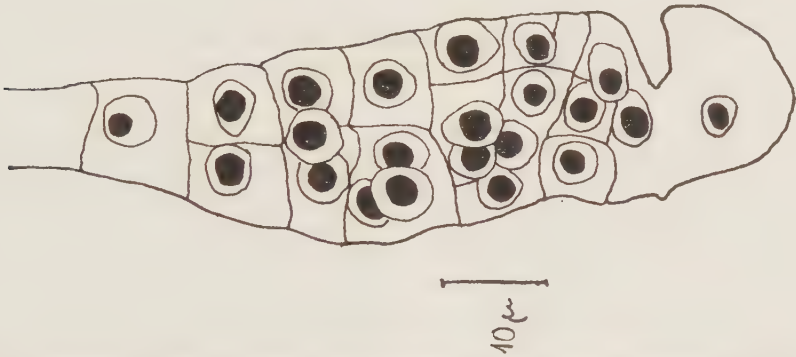


ABB. 7. Embryo 8 Tage nach der Bestäubung (F) nach Bestrahlung mit 12 kR. Der apikale Teil des Suspensors kann vom eigentlichen Embryo nicht unterschieden werden.

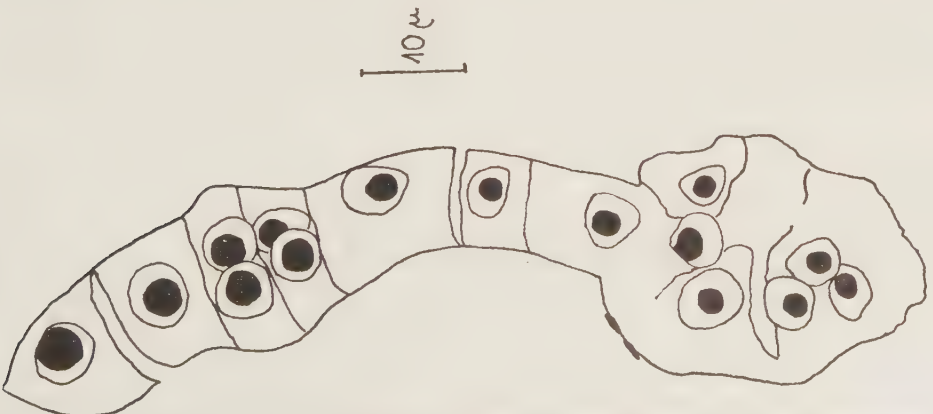


ABB. 8. Embryo 8 Tage nach der Bestäubung (F) nach Bestrahlung mit 12 kR. Köpfchen des Embryos in Degeneration (Hohlräume im Embryo, wellige Umrisse). Im mittleren Bereich des Suspensors kommt es zu zusätzlichen Teilungen.

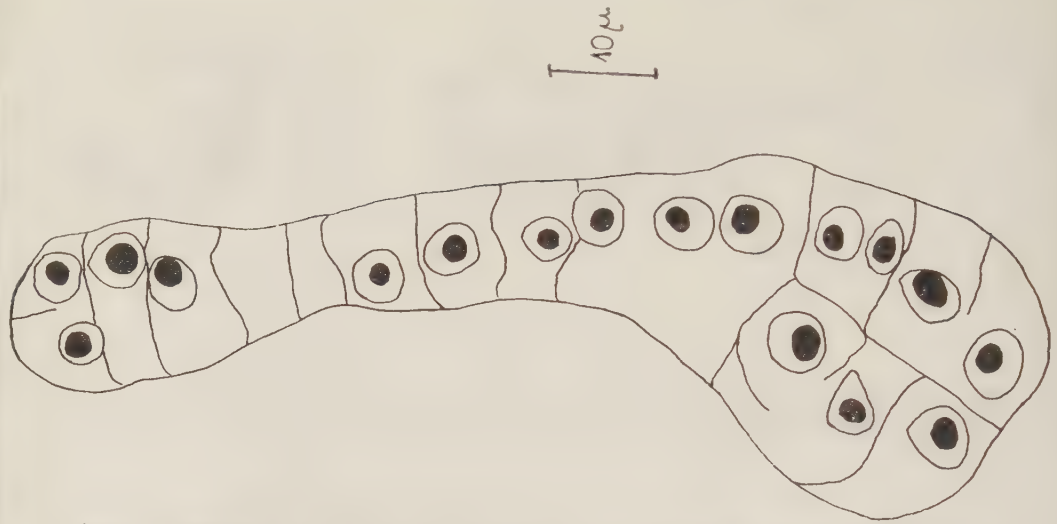


ABB. 10. Embryo 8 Tage nach der Bestäubung (F) nach Bestrahlung mit 4 kR. Zusätzliche Teilung der mikropylar gelegenen Suspensorzellen.

ch Maheshwari und Sachar⁽¹²⁾ als Teilungspolyembryonie bezeichnet. Teilungspolyembryonie kann nach allen verwendeten Dosen induziert werden. Nach Bestrahlung mit den höchsten Dosen wird sie jedoch wesentlich häufiger beobachtet. Der Zeitpunkt der Bestäubung hat keinen Einfluss auf die Induktion der Teilungspolyembryonie.

Die Suspensoren dieser aberranten Embryonen sind meistens auch verlängert, das heisst, die Anzahl der Zellen in der Zellreihe ist erhöht. Die verlängerten Suspensoren können nach der Bestrahlung auch an sonst normal ausgebildeten Embryonen im kugelförmigen Stadium beobachtet werden (Abb 12). Alle zusätzlichen

Teilungen im Suspensor treten frühestens 4 Tage nach der Bestäubung auf. Vorher unterscheiden sich die Suspensorzellen nicht von den Kontrollen.

Alle diese aberranten Embryonen sind 8 Tage nach der Bestäubung noch auf dem kugelförmigen Stadium und besitzen noch kein Dermatogen. Häufig sind einzelne oder alle Zellen (Abb. 9) der aberranten Embryonen degeneriert. Die Degeneration äussert sich in einer Karyolyse und stärkerer Färbbarkeit des Cytoplasmas. Weitere Anzeichen für eine Schädigung des Embryos sind erstens Hohlräume, die zwischen den sonst lückenlos aneinanderschliessenden Zellen auftreten. Zweitens sind die

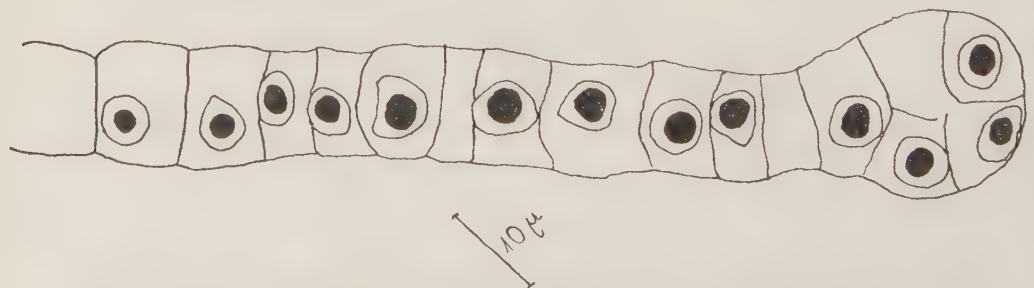


ABB. 12. Embryo 6 Tage nach der Bestäubung (S) nach der Bestrahlung mit 2 kR. Stark verlängerter Suspensor.

Umriss der Embryonen häufig nicht mehr glatt, sondern mehr oder weniger gewellt.

Einen Hinweis, dass der Übergang vom kugelförmigen zum Herzstadium ein empfindliches Stadium darstellt, geben die Untersuchungen von Devreux und Scarascia Mugnozza⁽⁵⁾ an 1–2 zelligen Proembryonen von *Nicotiana rustica*, die einer γ -Bestrahlung ausgesetzt waren. Die Embryonen entwickelten sich nur bis zum kugelförmigen Stadium und degenerierten anschliessend. Ebenso können in der tierischen Embryonalentwicklung nach einer Röntgenbestrahlung weiblicher (Oocyten) und männlicher (Spermien) Tiere von *Drosophila melanogaster*, die nach der Bestrahlung mit unbestrahlten Tieren gekreuzt wurden, bei einem Teil der Embryonen wohl Zellteilungen aber keine Differenzierungen stattfinden (Sonnenblick).⁽¹⁹⁾ Nach chronischer γ -Bestrahlung von *Capsella*-Pflanzen beobachtete auch Devreux⁽⁴⁾ Embryonen, deren Suspensoren manchmal 2 Zellreihen breit waren. Verlängerte Suspensoren konnten sowohl nach einer γ -Bestrahlung 1–2 zelliger Proembryonen von *Nicotiana rustica* (Devreux und Scarascia Mugnozza)⁽⁵⁾ als auch nach chronischer γ -Bestrahlung von *Capsella*-Pflanzen (Devreux⁽⁴⁾) beobachtet werden. Über ein spontanes Vorkommen von Embryoknospung wird von Cooper⁽¹⁾ bei *Nicotiana rustica* berichtet. Die Bildung überzähliger Embryoanlagen aus dem Suspensor (Teilungspolyembryonie) ist in verschiedenen Gattungen beobachtet worden (Crete,^(2,3) Kausnik und Subramanyam,⁽⁹⁾ Maheshwari und Negi,⁽¹¹⁾ Subramanyam⁽²⁰⁾). Während diese Form der Polyembryonie bis jetzt nur spontan auftrat, konnte sie bei *Arabidopsis thaliana* nach Röntgenbestrahlung der Eizelle, also nur eines Genoms, erstmals induziert werden. Polyembryonie bei *Arabidopsis* beobachtet man meistens dann, wenn im eigentlichen Embryokörper Bezirke degenerierter Zellen vorliegen. In den Suspensorzellen sind dagegen nur selten Degenerationen zu finden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Haccius und Reichert⁽⁸⁾ an Embryonen röntgenbestrahlter *Eranthis*-Samen. Die Degenerationen traten bei *Eranthis* zuerst am apikalen Bereich des Embryokörpers auf, während der Suspensor auch hier am längsten erhalten blieb. Obwohl bei *Eran-*

this und *Arabidopsis* unterschiedliche Entwicklungsstadien bestrahlt wurden, zeigt der Abfall der Degenerationen weitgehende Übereinstimmung.

Zwischen der Bestrahlung und dem ersten Auftreten der abnormen Teilungen im Suspensor vergehen mindestens 4 Tage, vorher laufen die Teilungen normal ab. Durch die Wirkung der ionisierenden Strahlen auf die Fruchtknoten werden im Eizellkern und sekundären Embryosackkern Schäden verursacht, die zunächst nicht sichtbar sind, sondern erst nach einigen Zellteilungen auftreten. Die Schäden können in Form von Kerndegenerationen im Embryo und im Endosperm zu einem Entwicklungsstopp auf dem kugelförmigen Stadium beobachtet werden. Es scheint, dass einige der möglichen Ursachen diskutiert werden, die für die Teilungen im Suspensor in Betracht kommen könnten.

1. Die Degenerationen im Embryo sind die Ursache für die Teilungen im Suspensor. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Haccius⁽⁷⁾ an *Eranthis* unterstützt. Aus dem Suspensor, der durch Pufferlösungen (pH 4,5) abgetöteten Embryonen konnten sich keine Embryonen ausbilden, die sich nicht von normalen Embryonen unterscheiden. Diese Erklärung reicht für viele, aber nicht für alle Embryonen aus. Zusätzliche Teilungen im Suspensor können auch ohne sichtbare Degenerationen im Embryo beobachtet werden. Es handelt sich jedoch auch hier um geschädigte Embryonen, deren Entwicklung auf dem kugelförmigen Stadium gestoppt wird. Dieser Entwicklungsstopp könnte ebenso durch abnorme Teilungen veranlassen.⁽²⁾

3. Die Degenerationen im Endosperm sind die Ursache für die aberrante Embryoentwicklung. Diese Annahme ist ebenfalls wahrscheinlich. Während degenerierte Endospermzellen die Embryoentwicklung von *Arabidopsis thaliana* bis zum frühen kugelförmigen Stadium nicht beeinflussen. (Abb. 4), scheinen spätere Stadien auf ein gut entwickeltes Endosperm angewiesen zu sein. So waren einige der aberranten Embryonen von einem degenerierten Endosperm umgeben. Hinweise, dass für ein geordnetes Wachstum des Embryos Ernährungsfaktoren eine Rolle spielen, finden sich in der Literatur über künstliche Embryokultur (zum Bei-

heshwari,⁽¹⁰⁾ Maheshwari und Rangaswari⁽¹³⁾).

In einer Reihe von Familien kommen als el massige Suspensoren vor; es handelt sich also um ein genetisch fixiertes Merkmal. Alle Zellen des Embryos die gleiche genetische Information besitzen, die Embryoentwicklung aber immer in einem für die betreffende Gattung charakteristischen Teilungster verläuft, müssen dieselben Gene in den verschiedenen Zellen unterschiedlich aktiv sein. Nach der Bestrahlung könnte nun in die Aktivität eingegriffen werden, wodurch die Suspensorzellen die Möglichkeit hätten wieder "bryonal" zu werden.

Da es dem Zufall überlassen bleibt, welchen von den Fruchtknoten die ionisierenden Strahlen treffen, ist es schwer zu entscheiden, welche der diskutierten Möglichkeiten für aberranten Teilungen verantwortlich sind. Hier spielen hier mehrere Faktoren eine Rolle.

Dankensungen—Herrn Prof. Dr. ARNOLD danke ich für Anregung zu dieser Arbeit sowie für die stete Unterstützung bei ihrer Durchführung. Herrn Prof. DR. HAUPT und Herrn Prof. Dr. KESSLER danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

LITERATUR

- COOPER D. C. (1943) Haploid-diploid twin embryos in *Lilium* and *Nicotiana*. *Amer. J. Bot.* **30**, 408–413.
- CRETE P. (1938) La polyembryonie chez le *Obelia syphilitica* L. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **85**, 580–583.
- CRETE P. (1944) Polyembryonie chez l'*Actinidia chinensis*. Planch. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **91**, 89–92.
- DEVREUX M. (1963) Effets de l'irradiation gamma chronique sur l'embryogenèse de *Capsella bursa pastoris* Moench. VI Congresso nucleare di Roma, L'Energia Nucleare in Agricoltura 99–217.
- DEVREUX M. et SCARASCIA MUGNOZZA G. T. (1962) Action des rayons gamma sur les premiers stades de development de l'embryon de *Nicotiana glauca* L. *Caryologia* **15**, 279–291.
- GERLACH-CRUSE D. (1969) Experimentelle Auslösung von Semigamie bei *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. (im Druck).
- HACCIUS B. (1965) Weitere Untersuchungen über Somatogenese aus den Suspensorzellen von *Eranthis hiemalis* Embryonen. *Planta* **64**, 219–224.
- HACCIUS B. und REICHERT H. (1964) Restitutionserscheinungen an pflanzlichen Meristemen nach Röntgenbestrahlung II. Adventiv—Embryonie nach Samenbestrahlung von *Eranthis hiemalis*. *Planta* **62**, 355–372.
- KAUSNIK S. B. and SUBRAMANYAM K. (1946) A case of polyembryony in *Isotoma longifolia* Presl. *Curr. Sci.* **15**, 257–258.
- MAHESHWARI P. (1950) *An introduction to the Embryology of Angiosperms* New York, Toronto, London.
- MAHESHWARI P. and NEGI V. (1955) The embryology of *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) Nees. *Phytomorphology* **5**, 456–472.
- MAHESHWARI P. and SACHAR R. C. (1963) Polyembryony. In: *Recent advances in the embryology of Angiosperms*. Dehli.
- MAHESHWARI P. and RANGASWAMY N. S. (1965) Embryology in relation to physiology and genetics. *Adv. Bot. Res.* **2**, 219–321.
- MERICLE L. W. and MERICLE R. P. (1961) Radiosensitivity of the developing plant embryo. *Brookhaven Symposia in Biology* **14**, 262–286.
- REINHOLZ E. (1945) Auslösung von Röntgenmutationen bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. und ihre Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und Evolutionstheorie. Diss. Frankfurt a/M.
- REINHOLZ E. (1959) Beeinflussung der Morphogenese embryonaler Organe durch ionisierende Strahlungen I Keimlingsanomalien durch Röntgenbestrahlung von *Arabidopsis thaliana*—Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien. *Strahlentherapie* **109**, 537–553.
- ROMEIS B. (1948) Mikroskopische Technik. München.
- SCHNARF K. (1929) Embryologie der Angiospermen. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie* **10**, 2a.
- Sonnenblick B. P. (1940) Cytology and development of the embryos of X-rayed adult *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **26**, 373–381.
- SUBRAMANYAM K. (1944) A contribution of the life history of *Sonerila wallichii* Benn. *Proc. Indian Acad. Sci. B* **19**, 115–120.
- TISCHLER G. (1951) Allgemeine Pflanzenkaryologie. In: *Handbuch der Pflanzenanatomie* **2**, 2.
- VASSILEVA-DRYANOVSKA O. A. (1966) Development of embryo and endosperm produced after irradiation of pollen in *Tradescantia*. *Hereditas* **55**, 129–148.

Sonderdruck aus
„BIOLOGISCHES ZENTRALBLATT“

Band 89 (1970), Heft 4

Herausgabe und Redaktion: H. Autrum, R. Harder, A. Kühn, H. Stubbe

VEB GEORG THIEME, LEIPZIG

Experimentelle Auslösung von Semigamie
bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Von D. GERLACH-CRUSE

Experimentelle Auslösung von Semigamie bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Von D. GERLACH-CRUSE

Botanisches Institut der Universität Erlangen – Nürnberg

Mit 25 Abbildungen

Einleitung

Der Nachweis einer außerkaryotischen Vererbung würde erleichtert, wenn die Herstellung von Pflanzen gelänge, deren Zytoplasma bestrahlt, deren Kerne aber unbestrahlt sind. Eine isolierte Bestrahlung des Zytoplasmas, die für diese Untersuchungen vorteilhaft wäre, bereitet jedoch bei höheren Pflanzen Schwierigkeiten. Prinzipiell bieten sich zwei Wege an, um zu der gewünschten Kombination unbestrahlter Kern in einem bestrahlten Zytoplasma zu gelangen.

1. Der Eizellkern wird durch ionisierende Strahlen abgetötet, und die dann kernlose Eizelle durch einen eingebrachten ♂ Kern zur Entwicklung angeregt. Die Chromosomen des sich daraus entwickelnden Embryos stammen vom Vater, während das bestrahlte Zytoplasma von der Mutter geliefert wird. Diese Entwicklung wird als Androgenese bezeichnet. Androgenese kann bei Tieren experimentell induziert werden. An *Habrobracon juglandis* konnte sogar der zytologische Nachweis erbracht werden (WHITING 1948). Eine androgenetische Entwicklung wird für viele vatergleiche Pflanzen, die aus der Kreuzung verschiedener Arten (z. B. CLAUSEN und LAMMERTS 1929, HAUSTEIN 1961) wie auch nach einer Röntgenbestrahlung von Fruchtknoten (GERASSIMOVA 1936, EHRENSBERGER 1948) entstanden sind, angenommen. Der zytologische Beweis einer Androgenese bei Pflanzen steht jedoch noch aus (BATTAGLIA 1963, STEFFEN 1963).

2. Die Fusion zwischen Eizellkern und Spermakern wird verhindert und eine Teilung beider Kerne eingeleitet. Die Kerne des Embryos im mütterlichen Zytoplasma sind teils väterlichen, teils mütterlichen Ursprungs. Eine solche Entwicklung wird als Semigamie bezeichnet (BATTAGLIA 1945, 1946, 1947a, 1947b, 1954, 1955). Ließe sich eine Semigamie durch ionisierende Strahlen auslösen, so wäre hier die Forderung unbestrahlter Kern in einem bestrahlten Zytoplasma teilweise erfüllt.

Voraussetzung ist in beiden Fällen eine höhere Strahlenresistenz des Zytoplasmas. Nach den Ergebnissen von ULRICH (1956) an gesamten *Drosophila*-Eiern sowie den Untersuchungen von ORD und DANIELLI (1956) an *Amöben* wird das Zytoplasma erst durch höhere Strahlendosen als der Kern geschädigt. Andererseits gibt es Hinweise, daß eine Schädigung des Zellkerns durch ein bestrahltes Zytoplasma erfolgen kann (DURYEE 1949, ORD und DANIELLI 1956).

Es sollte nun zunächst geprüft werden, ob entweder der Eizellkern von *Arabidopsis thaliana* durch Röntgenstrahlen zur Degeneration gebracht, oder ob die Fusion zwischen Eizellkern und Spermakern verhindert werden kann.

Material und Methoden

Die Crucifere *Arabidopsis thaliana* war wegen ihrer für höhere Pflanzen kurzen Generationsfolge besonders für die vorliegende Fragestellung geeignet. Verwendet wurde die von REINHOLZ (1945) beschriebene Rasse Enkheim sowie die Mutante *co hy* einer aus Columbia (USA) stammenden Rasse (REDEI, persönliche Mitteilung).

Aufzucht

Die Keimung der Samen erfolgte in Petrischalen auf angefeuchtem Filtrierpapier. Sobald sich die Kotyledonen entfaltet hatten, wurden die Keimlinge in sterilisierte Komposterde pikiert. Die Aufzucht der Pflanzen erfolgte unter Gewächshausbedingungen. Zur Röntgenbestrahlung wurden die Pflanzen im Rosettenstadium einzeln in Töpfe von 7 cm Durchmesser gepflanzt. Vom Herbst bis zum zeitigen Frühjahr wurde Zusatzlicht gegeben.

Herstellung der Tetraploiden

Damit im Falle einer Semigamie diploide Pflanzen entstehen konnten, war es notwendig, Pflanzen zu tetraploidisieren. Pflänzchen mit höchstens vier Blättchen der Mutante *co hy* und der Enkheimer Rasse wurden wie folgt behandelt: Kleine, etwa 2 mm² große mit Colchicininlösung getränkte Zellstoffstückchen wurden möglichst nahe an den Vegetationskegel gebracht. Die Konzentration der verwendeten Lösungen betrug 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08% und 0,10%; die Dauer der Einwirkung 11, 22 und 33 Stunden für jede Konzentration. Tagsüber wurden die Zellstoffstückchen alle 2 Stunden mit 1–2 Tropfen der Colchicininlösung befeuchtet. Die Töpfe waren während der ganzen Einwirkung zur Herabsetzung der Verdunstung mit Glasplatten bedeckt.

Ermittlung der Chromosomenzahl

A) an Hand der Chromozentren (GEITLER 1949)

Bei *Arabidopsis thaliana* entspricht die Zahl der Chromozentren der Chromosomenzahl (LAIBACH 1907). Junge Blütenknospen, deren Petalen noch von den Sepalen umhüllt waren, wurden in Alkohol-Eisessig (3:1) fixiert. Die Chromozentrenzählung erfolgte an Ruhekernen der isolierten Blütenblätter, die dazu in einen Tropfen Karminessigsäure gelegt, mit einem Deckglas bedeckt, leicht erwärmt und vorsichtig gequetscht wurden.

B) an Hand der Pollenkörner

Geöffnete Blüten wurden in einen Tropfen Paraffinöl gelegt und mit einem Deckglas bedeckt. Die haploiden Pollenkörner sind in der Aufsicht länglich, an beiden Enden etwas zugespitzt und besitzen 3 Keimporen (Abb. 1a). Diploide Pollenkörner, die 4 Keimporen aufweisen, sind dagegen in der Aufsicht breiter und an beiden Enden etwas abgeplattet (Abb. 1b).

C) an Hand der Chromosomenzahl

Wegen der geringen Größe der Knospen, welche die meiotischen Teilungen durchlaufen, wurden ganze Infloreszenzen in Alkohol-Eisessig fixiert und dann mit Karminessigsäure + FeCl₃ angefärbt. Die einzelnen Knospen der Infloreszenz wurden getrennt zu Quetschpräparaten verarbeitet.

Die durch die Colchicinbehandlung entstandenen Chimären wurden geselbstet. In der folgenden Generation erfolgte die Auswahl der tetraploiden Pflanzen. Bezüglich ihrer Chromosomenzahl bleiben jedoch die tetraploiden Pflanzen in den Folgegenerationen nicht absolut konstant. Neben

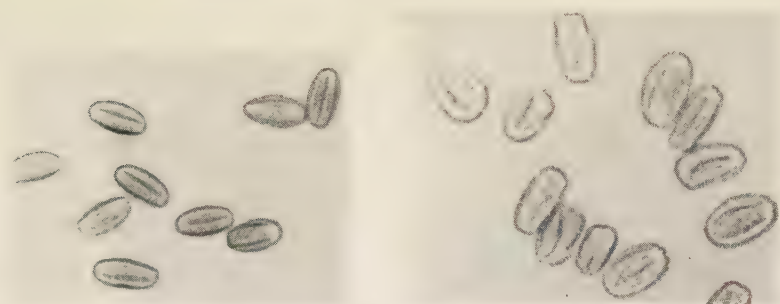


Abb. 1a

Abb. 1b

Abb. 1a. Haploide Pollenkörner in Aufsicht; 1b. Diploide Pollenkörner in Aufsicht

der zu erwartenden 10–10 Verteilung in der Meiose beobachtet man zuweilen auch eine 9–11 Verteilung; außerdem können einzelne Chromosomen in der Metaphasenplatte liegen bleiben. Es ist deshalb notwendig, die Tetraploiden in jeder Generation erneut zu ermitteln.

Bestrahlungsbedingungen

Beim Kastrieren der Blütenknospen wurden außer den Antheren auch die Kelch- und Blütenblätter entfernt. Vorversuche ergaben, daß diese Behandlung die weitere Entwicklung nicht beeinträchtigte. Um eine genaue Orientierung der Pflanzen zur Strahlenquelle zu ermöglichen, war es zweckmäßig, die Pflanzen einzeln zu bestrahlen. Die Ausrichtung der zwei Fruchtknoten, die pro Pflanze bestrahlt wurden, erfolgte so, daß sie beide den gleichen Abstand zur Strahlenquelle einnahmen. Die Bestrahlungen erfolgten mit einer Dermopan-Röhre (56 kV, 2 mA, FHA 10 cm, Filter 0,1 mm Al). Die Dosisleistung betrug 2000 R/min (Dosismessung mit einer Phantomkammer am Siemens Universaldosimeter). Die Bestrahlungen wurden im August und September 1965 und 1966 im Institut für Medizinische Strahlenkunde der Universität Erlangen – Nürnberg durchgeführt.

Histologische Untersuchungen

Bestrahlte und unbestrahlte Fruchtknoten wurden nach Fixierung in Alkohol-Eisessig (3:1) über Chloroform in Paraffin eingebettet. Die Färbung der 10 μ dicken Schnitte erfolgte mit Eisentrionyhmämatein nach Hansen (ROMEIS 1948).

Ergebnisse

Histologische Untersuchungen

Hierzu wurden Fruchtknoten diploider Pflanzen der Rasse Enkheim mit 1, 2, 4, 8 und 12 kR bestrahlt, die Fruchtknoten tetraploider Pflanzen dagegen mit 1, 2, 4, 8 und 16 kR. Die Bestäubung erfolgte mit unbestrahltem haploiden Pollen der Rasse Enkheim bei einem Teil der Pflanzen etwa 6 Stunden (Frühbestäubung), beim anderen Teil etwa 24 Stunden (Spätbestäubung) nach der Bestrahlung. Die Fixierung der Fruchtknoten erfolgte bei den diploiden Pflanzen 1, 2, 4, 6 und 8 Tage nach der Bestäubung, bei den tetraploiden Pflanzen 1, 2 und 4 Tage nach der Bestäubung. Zusätzlich wurden 6 und 24 Stunden nach der Bestrahlung

Tabelle 1. Anzahl der bestrahlten Pflanzen für die histologischen Untersuchungen

a) diploide Pflanzen	1 kR	2 kR	4 kR	8 kR	12 kR
6 Std. nach der Bestrahlung	10	10	10	10	10
24 Std. nach der Bestrahlung	10	10	10	10	10
1 Tag nach der Bestäubung (F)	10	10	10	10	10
1 Tag nach der Bestäubung (S)	10	10	10	10	10
2 Tage nach der Bestäubung (F)	14	19	19	22	18
2 Tage nach der Bestäubung (S)	12	12	13	12	12
4 Tage nach der Bestäubung (F)	12	11	15	21	16
4 Tage nach der Bestäubung (S)	10	11	10	10	10
6 Tage nach der Bestäubung (F)	7	4	4	4	4
6 Tage nach der Bestäubung (S)	4	4	4	4	4
8 Tage nach der Bestäubung (F)	5	5	5	5	5
8 Tage nach der Bestäubung (S)	6	7	8	9	7

b) tetraploide Pflanzen	1 kR	2 kR	4 kR	8 kR	16 kR
6 Std. nach der Bestrahlung	6	5	5	5	5
24 Std. nach der Bestrahlung	3	3	3	3	3
1 Tag nach der Bestäubung (F)	5	5	5	5	5
1 Tag nach der Bestäubung (S)	3	3	3	3	3
2 Tage nach der Bestäubung (F)	5	5	5	5	5
2 Tage nach der Bestäubung (S)	10	10	10	10	10
4 Tage nach der Bestäubung (F)	5	5	5	5	5

Fruchtknoten fixiert, deren Narben nicht bestäubt waren. Die Gesamtzahl der bestrahlten Pflanzen betrug 765. Nachdem unter den gegebenen Bedingungen zwei Blüten pro Tag aufblühen und jeder Fruchtknoten etwa 50 Samenanlagen enthält, wurden insgesamt 76 500 Samenanlagen bestrahlt. Die Zuordnung zu den einzelnen Serien ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

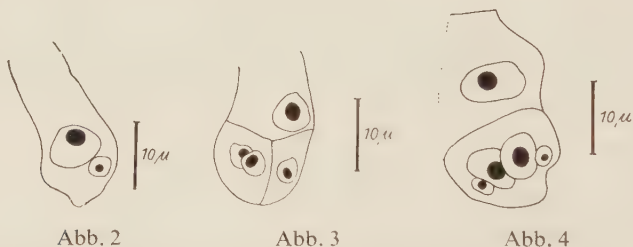


Abb. 2. Beginn einer Semigamie 1 Tag nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 12 kR (haploider Eizellkern)

Abb. 3. Semigamie 2 Tage nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 4 kR (haploider Eizellkern). Die kleinen ♂ Kerne liegen im Embryokörper, ein großer ♀ Kern im Suspensor

Abb. 4. Semigamie 2 Tage nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 2 kR (diploider Eizellkern). 2 kleine ♂ Kerne und 2 große ♀ Kerne liegen im eigentlichen Embryo, während im Suspensor ein großer ♀ Kern liegt

6 und 24 Stunden nach der Bestrahlung können sowohl an den Kernen der 2n- als auch der n-Eizellen keine Degenerationen festgestellt werden. Eine Untersuchung der Eizellkerne 2 Tage nach der Bestrahlung erübrigte sich, da zu diesem Zeitpunkt die Bestäubungen nicht mehr erfolgreich sind. Eine Androgenese läßt sich deshalb bei *Arabidopsis thaliana* unter den gegebenen Bedingungen nicht induzieren.

Nach der Fruchtknotenbestrahlung wird jedoch gelegentlich die Fusion zwischen Eizellkern und Spermakern unterbunden und eine Teilung der beiden nicht verschmolzenen Kerne eingeleitet = Semigamie. Abbildung 2 zeigt den Beginn einer semigamen Entwicklung: Neben dem großen Eizellkern liegt ein wesentlich kleinerer Kern von der Größe eines Spermakerns. Im Verlauf der Embryo-

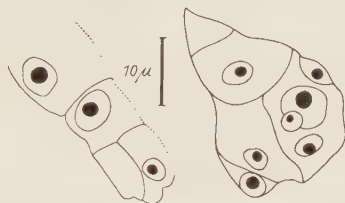


Abb. 5. Semigamie 2 Tage nach der Bestäubung (S) nach einer Bestrahlung mit 1 kR (haploider Eizellkern). 6 kleine ♂ Kerne und 1 großer ♀ Kern liegen im Embryokörper, 3 große Kerne im Suspensor

entwicklung teilen sich die mütterlichen und die väterlichen Kerne unabhängig voneinander, was dann zu Embryonen mit teils mütterlichen und teils väterlichen Bezirken führt (Abb. 3, 4, 5, 6, 7). Die ♂ Kerne können in allen Teilen des Embryos, also auch im Suspensor liegen (Abb. 8). Wie die Abbildungen 9 und 10 zeigen, sind bei den Kontrollen die Kerne immer gleich groß. Während zu Beginn der Embryoentwicklung der Durchmesser der mütterlichen Kerne etwa 2 bis 3mal größer ist als derjenige der väterlichen Kerne, sind später auch die ♀ Kerne sehr klein und nicht mehr deutlich von den Kernen ♂ Ursprungs zu unterscheiden. Die Chimären können deshalb mit Sicherheit nur etwa bis zum 16 Zellstadium ermittelt werden. Die ♂ Kerne fügen sich nicht immer in das für den *Arabidopsis*-Embryo typische Zellteilungsmuster ein (Abb. 4, 5). Bemerkenswert ist, daß bei den semigamen Embryonen manchmal 2- oder 3kernige Zellen vorkommen, wobei ein ♀ Kern mit einem oder zwei ♂ Kernen in einer Zelle liegt. Gelegentlich degenerieren einzelne Kerne der semigamen Embryonen. Diese degenerierten Kerne könnten strahlengeschädigte ♀ Kerne sein, zumal davon erstens nur die großen Kerne betroffen werden und zweitens die Degenerationen immer erst nach einigen Kernteilungen eintreten. Nach einer Fruchtknotenbestrahlung degenerierten die Embryo- und Endospermkerne nicht semigamer Embryonen auch immer erst nach einigen Teilungen (GERLACH-CRUSE 1969). Eine Degeneration der väterlichen Kerne wird jedoch nie beobachtet. Gelegentlich verschmelzen zwei kleine ♂ Kerne miteinander = Autogamie (GERLACH 1965). Einige der semigamen Embryonen entwickeln sich langsamer als die nicht semigamen Embryonen derselben Schote.

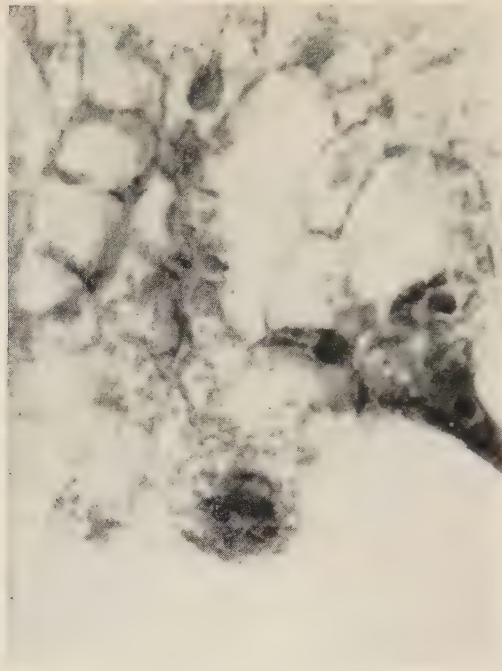


Abb. 6. Semigamie 2 Tage nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 8 kR (haploider Eizellkern). Kleine ♂ Kerne im eigentlichen Embryo, ein großer Kern im Suspensor

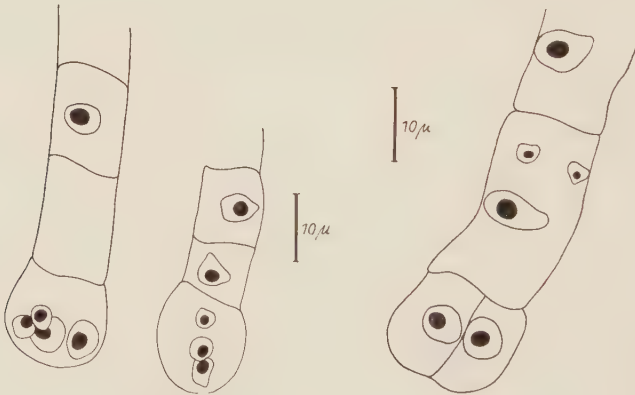


Abb. 7

Abb. 8

Abb. 7. Semigamie 4 Tage nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 1 kR (haploider Eizellkern). Kleine ♂ Kerne und große ♀ Kerne liegen im Embryokörper

Abb. 8. Semigamie 2 Tage nach der Bestäubung (F) nach einer Bestrahlung mit 4 kR (haploider Eizellkern). Die ♂ Kerne liegen im Suspensor

Die Chromosomenzahl der kleinen ♂ Kerne ließ sich nicht feststellen, da keine Mitosen vorhanden waren. Auch BATTAGLIA konnte Kernteilungen des ♂ Kernes bei *Rudbeckia* trotz des hohen Prozentsatzes der hier beobachteten Semigamie nur sehr selten finden.

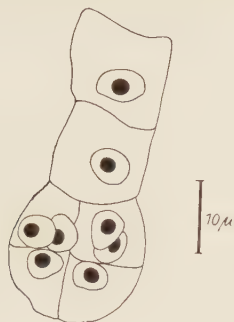


Abb. 9



Abb. 10

Abb. 9. 8zelliger diploider Embryo (Kontrolle) 2 Tage nach der Bestäubung (S). Die Kerne sind alle gleich groß.

Abb. 10. 2zelliger triploider Embryo (Kontrolle) 2 Tage nach der Bestäubung (F). Die Kerne sind alle gleich groß

Semigamie wurde erstmals von BATTAGLIA (1945) bei verschiedenen *Rudbeckia*-Arten beobachtet. Bei allen *Rudbeckia*-Arten trat die Semigamie jedoch spontan auf, bei *Rudbeckia speciosa* sogar zu 79 %. Die an *Arabidopsis thaliana* erstmalig experimentell induzierte Semigamie war weder von der Dosis abhängig, noch hatte der Zeitpunkt der Bestäubung einen Einfluß auf ihre Induktion. Im histologischen Bild herrscht zwischen der Semigamie bei *Rudbeckia* und *Arabidopsis* weitgehende Übereinstimmung. Diese Übereinstimmung bezieht sich auch auf die teilweise Mehrkernigkeit der Zellen und die Möglichkeit einer Fusion zwischen zwei ♂ Kernen. Bei der von COE (1953) bei *Cooperia pedunculata* ebenfalls spontan aufgetretenen Semigamie war die Zahl der ♂ Kerne, die nur im basalen Teil des Embryos vorkamen, auf zwei beschränkt.

Genetische Untersuchungen

Es sollte geprüft werden, ob sich die durch eine Semigamie entstandenen Embryonen weiterentwickeln. Dabei besteht die Möglichkeit, daß daraus Pflanzen entstehen, die teilweise die Kombination bestrahlter väterlicher Kern in einem bestrahlten mütterlichen Zytoplasma besitzen. Es hängt nun ganz davon ab, ob die semigamen Bezirke des Embryos an der Bildung des Keimlings bzw. der Pflanze teilnehmen. Aus welchen Bezirken des Embryos sich die Organe des Keimlings entwickeln, geht aus der Abbildung 11 hervor. Zum genetischen Nachweis einer Semigamie sind rezessive Mutanten von Vorteil, die bereits als Keimlinge die rezessiven Merkmale gut zeigen. Deshalb bot sich die Mutante *co hy* an.

Hy, ein pleiotropes Gen, bewirkt einerseits eine Verlängerung des Hypokotyls, andererseits hellgrüne Kotyledonen und Blätter, während durch das Gen *co* ein späterer Blühtermin hervorgerufen wird. Die Gene *co* und *hy* sind nicht ge-

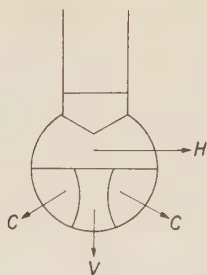


Abb. 11. Das Schema zeigt die Bezirke, aus denen die einzelnen Organe des Embryos hervorgehen (C = Cotyledo, H = Hypokotyl, V = Vegetationskegel)

koppelt (REDEI, persönliche Mitteilung). In der Kreuzung *co hy* mit Enkheim (kurzes Hypokotyl, dunkelgrüne Kotyledonen und Blätter, früher Blühtermin) sowie in der reziproken Kreuzung verhält sich *co* dominant, *hy* rezessiv.

1. Vorversuche

Werden die Pflanzen nach einer Fruchtknotenbestrahlung mit haploidem Pollen bestäubt, so sind im Falle einer Semigamie haploide Pflanzen zu erwarten. Haploide Pflanzen sind jedoch für weitere genetische Untersuchungen ungeeignet. Deshalb war eine Bestäubung mit diploidem Pollen angebracht. Zunächst sollte geprüft werden, ob $2n \times 4n$ Kreuzungen bei *Arabidopsis* erfolgreich sind. Hierzu wurde das Wachstum der Pollenschläuche im Griffel durch Anfärben der Kallosepfropfen mit Resorcinblau verfolgt (CONN et al. 1962). 10 Stunden nach der Bestäubung hatten die $2n$ Pollenschläuche genauso wie die n Pollenschläuche der $2n \times 2n$ Kontrollkreuzung die Griffel durchgewachsen. Die Embryoentwicklung wurde nach der Methode von ARNOLD und CRUSE (1968) 2 und 8 Tage nach der Bestäubung verfolgt. Während alle Embryonen der $2n \times 2n$ Kreuzung 2 Tage nach der Bestäubung im 4 bis 8 Zellstadium sind, findet man in der Kreuzung $2n \times 4n$ nur 10 bis 40 % der Samenanlagen mit Embryonen. Das gleiche Verhältnis zeigt sich 8 Tage nach der Bestäubung.

2. Bestrahlungsserien

Auf Grund der histologischen Ergebnisse waren folgende 3 Versuchsserien sinnvoll. In allen 3 Serien wurden Fruchtknoten der Rasse Enkheim bestrahlt und dann mit unbestrahltem Pollen der Mutante *co hy* bestäubt. 1. Fruchtknoten von $2n$ und $4n$ Pflanzen wurden jeweils mit 2, 4 und 8 kR bestrahlt und etwa 6 Stunden nach der Bestrahlung a) mit diploidem, b) mit haploidem Pollen bestäubt. 2. Die mit 1 und 2 kR bestrahlten Fruchtknoten von $2n$ und $4n$ Pflanzen wurden 24 Stunden nach der Bestrahlung bestäubt, und zwar a) mit diploidem, b) mit

haploidem Pollen. Eine dritte Serie, deren Pflanzenzahl jedoch infolge methodischer Schwierigkeiten gering war, wurde mit 4 kR bestrahlt und unmittelbar nach der Bestrahlung bestäubt. Die möglichen Kombinationen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Von 247 Pflanzen wurden je 2 Fruchtknoten bestrahlt, die jeweils etwa 50 Samenanlagen enthielten. Insgesamt waren deshalb etwa 24700 Samenanlagen einer Bestrahlung ausgesetzt.

Tabelle 2. Anzahl der bestrahlten Pflanzen
für die genetischen Untersuchungen

1. 6 Stunden nach der Bestrahlung bestäubt		
♀ En (2n) × ♂ <i>co hy</i> (2n)	2 kR	10 Pflanzen
	4 kR	10 Pflanzen
	8 kR	10 Pflanzen
♀ En (4n) × ♂ <i>co hy</i> (2n)	2 kR	10 Pflanzen
	4 kR	10 Pflanzen
	8 kR	10 Pflanzen
♀ En (2n) × ♂ <i>co hy</i> (4n)	2 kR	10 Pflanzen
	4 kR	10 Pflanzen
	8 kR	9 Pflanzen
♀ En (4n) × ♂ <i>co hy</i> (4n)	2 kR	20 Pflanzen
	4 kR	15 Pflanzen
	8 kR	16 Pflanzen
2. 24 Stunden nach der Bestrahlung bestäubt		
♀ En (2n) × ♂ <i>co hy</i> (2n)	1 kR	13 Pflanzen
	2 kR	8 Pflanzen
♀ En (4n) × ♂ <i>co hy</i> (2n)	1 kR	10 Pflanzen
	2 kR	10 Pflanzen
♀ En (2n) × ♂ <i>co hy</i> (4n)	1 kR	10 Pflanzen
	2 kR	8 Pflanzen
♀ En (4n) × ♂ <i>co hy</i> (4n)	1 kR	19 Pflanzen
	2 kR	15 Pflanzen
3. unmittelbar nach der Bestrahlung bestäubt		
♀ En (2n) × ♂ <i>co hy</i> (2n)	4 kR	3 Pflanzen
♀ En (4n) × ♂ <i>co hy</i> (2n)	4 kR	3 Pflanzen
♀ En (2n) × ♂ <i>co hy</i> (4n)	4 kR	3 Pflanzen
♀ En (4n) × ♂ <i>co hy</i> (4n)	4 kR	4 Pflanzen

3. Genetischer Nachweis einer Semigamie

Aus den in Tabelle 2 aufgeführten Versuchsserien sind 4 Pflanzen mit väterlichen Merkmalen aufgetreten (Tab. 3). Sie gingen jeweils aus der Kreuzung En (2n) × *co hy* (4n) nach einer Bestrahlung mit 4 kR und nach Frühbestäubung hervor. In den einzelnen 2n × 4n Kreuzungen war der Anteil der semigamen Pflanzen unterschiedlich. In der Kreuzung E waren unter 84 Keimlingen ein semigamer

Tabelle 3. Anteil der semigamen Pflanzen
in den einzelnen En (2n) $\times$ co hy (4n) Kreuzungen

	Zahl der ausgelegten Samen	Zahl der Keimlinge	
		En	hy (semigame Pflanze)
E			
Kontrolle	107	92	—
2 kR	197	145	—
4 kR	123	83	1
8 kR	15	8	—
P			
Kontrolle	131	45	—
2 kR	40	18	—
4 kR	45	19	3
8 kR	28	9	—
Q			
Kontrolle	45	39	—
2 kR	106	17	—
4 kR	92	32	—
8 kR	78	29	—

Keimling, in der Kreuzung P drei semigame Keimlinge unter 22 Keimlingen. Diese drei Keimlinge sind die Nachkommen einer Pflanze. Die 4 Geschwister dieser drei Pflanzen zeigten die Merkmale der Enkheimer Rasse, wie es für die F_1 einer En (2n) $\times$ co hy (4n) Kreuzung zu erwarten ist. Unter den Nachkommen der Kreuzung Q war keine semigame Pflanze.

Beschreibung der semigamen Pflanzen

Die semigamen Pflanzen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe werden die Pflanzen gerechnet, die bezüglich des Gens hy mit der co hy Mutante identisch sind. Die zweite Gruppe umfaßt Pflanzen, die teils die hy Merkmale, teils die der Enkheimer Rasse zeigen. Einige der semigamen Pflanzen weichen jedoch etwas von der co hy Mutante ab.

1. Pflanzen mit hy Merkmalen

SG 5

SG 5 fällt durch eine verspätete Keimung auf. Die Länge des Hypokotyls und die Farbe der Kotyledonen des trikotylen Keimlings sind mit der co hy Kontrolle identisch (Abb. 12). Nachdem einige Rosettenblätter entwickelt sind, spaltet sich der Vegetationskegel. Beide Vegetationskegel entwickeln getrennte Rosetten (Abb. 13), die zunächst je einen Haupttrieb ausbilden. Während normalerweise bei *Arabidopsis* nur ein Haupttrieb gebildet wird, entwickelt eine der Rosetten einen zweiten Trieb, aus dem sich abnorme Triebe bilden. SG 5 besteht also aus 2 Rosetten, 2 normalen Trieben und aus mehreren kleineren Trieben = Abweichtertriebe. Die Abweichtertriebe unterscheiden sich von den normalen Trie-

ben. Sie sind häufig plattgedrückt und etwas verbändert. Die Stengelblätter sind kleiner und zahlreicher als an den normalen Trieben. Die Blüten, deren Zahl geringer als an den Infloreszenzen normaler Triebe ist, weisen häufig Blütenanomalien auf, zum Beispiel verwachsene Filamente sowie kelchblattartige Ge-

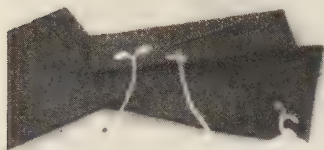


Abb. 12



Abb. 13

Abb. 12. Links Keimling von *co hy*, rechts von *En*, in der Mitte der durch eine Semigamie entstandene trikotyle Keimling von SG 5

Abb. 13. SG 5 mit 2 Vegetationspunkten.

bilde, die an ihrer Blattspitze narbenähnliche Papillen tragen. Außerdem können einzelne Antheren oder der Fruchtknoten fehlen. Die Pollenfertilität ist stark herabgesetzt. Aus den Antheren werden nur sehr wenige Pollenkörner von haploider Gestalt entlassen. Auch die Pollenfertilität der Blüten an den 2 normalen Trieben ist vermindert. Die Pollenkörner sind auch hier hauptsächlich von haploider Gestalt.

SG 6

Keimling mit langem Hypokotyl und hellgrünen Kotyledonen, die jedoch im Vergleich zur Kontrolle etwas schmaler und leicht ausgefranst sind. Die Keimung erfolgt zum normalen Zeitpunkt. Die Zahl der Rosetten- (Abb. 14) und Stengel-

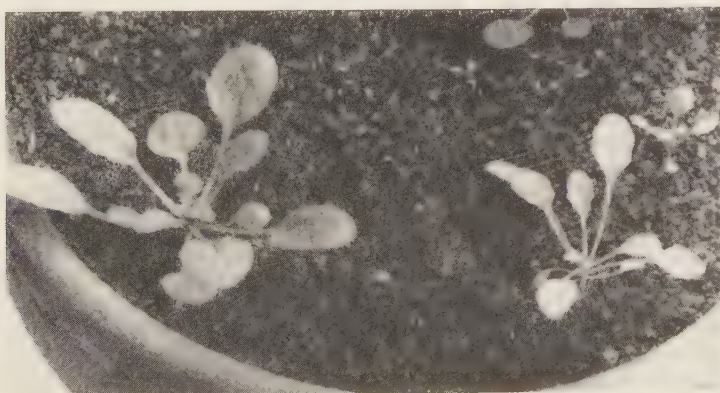


Abb. 14. Rechts SG 6, links ein triploides heterozygotes Geschwister von SG 6

blätter ist geringer als bei *co hy*. Die Farbe der Blätter stimmt mit der von *co hy* überein. Die Pflanze blüht eher als die *co hy* Kontrollen (Abb. 15). Die Antheren entlassen wenig, größtenteils haploiden Pollen.



Abb. 15. Links SG 6 blühend und fruchtend, rechts ein triploides Geschwister von SG 6

2. Pflanzen mit *hy* und *Enkheimer* Merkmalen (*Chimären*)

Während bei SG 5 und SG 6 sowohl das Hypokotyl als auch die Kotyledonen und der Vegetationskegel die Merkmale des Vaters tragen, sind bei diesen Pflanzen nur die Kotyledonen und der Vegetationskegel väterlichen Ursprungs. Das kurze Hypokotyl, also ein mütterliches Merkmal, muß aus solchen Bereichen des Embryos hervorgegangen sein, die von mütterlichen Kernen besetzt waren.

SG 8

Der Keimling, der ein kurzes Hypokotyl und hellgrüne Kotyledonen besitzt, keimt spät. Die Farbe der Rosetten- und Stengelblätter gleicht derjenigen der *co hy* Mutante. Die Pollenfertilität ist auch bei dieser Pflanze sehr gering. Neben den vielen kollabierten Pollenkörnern kommen wenige von haploider und diploider Gestalt vor.

SG 9

Der Keimling besitzt ein kurzes Hypokotyl, hellgrüne Kotyledonen und keimt spät. Die hellgrünen Rosettenblätter sind etwas breiter als bei der diploiden Kontrolle (Abb. 16). Auch die Blüten sind etwas größer als die der diploiden Ausgangsform. Beides weist auf einen höheren Ploidiegrad als $2n$ hin. Aus den Antheren werden nur wenige, vorwiegend haploide Pollenkörner entlassen.



Abb. 16. SG 9

4. Samenansatz der semigamen Pflanzen

Die Pollenfertilität war bei allen semigamen Pflanzen stark vermindert. Teils wurden die Pflanzen geselbstet, teils mit der Mutante *co hy* gekreuzt. Die Anzahl Samen pro Schote ist bei allen semigamen Pflanzen stark herabgesetzt (Tab. 4). Am geringsten ist der Samenansatz in den Schoten des Abweichtertriebs von SG 5,

Tabelle 4. Samenansatz der semigamen Pflanzen

SG 5 normaler Trieb $\times co\ hy\ 2n$	310 Samen/57 Schoten	= 5,4 Samen/Schote
SG 5 Abweichtertrieb selbst	5 Samen/ 2 Schoten	= 2,5 Samen/Schote
SG 5 Abweichtertrieb $\times co\ hy\ 2n$	21 Samen/ 8 Schoten	= 2,6 Samen/Schote
SG 6 selbst	289 Samen/58 Schoten	= 5,0 Samen/Schote
SG 6 $\times co\ hy\ 2n$	69 Samen/ 7 Schoten	= 9,9 Samen/Schote
SG 8 $\times co\ hy\ 2n$	36 Samen/ 5 Schoten	= 9,2 Samen/Schote
SG 9 selbst	42 Samen/ 7 Schoten	= 6,0 Samen/Schote
SG 9 $\times co\ hy\ 2n$	149 Samen/19 Schoten	= 7,8 Samen/Schote

wobei praktisch kein Unterschied zwischen Selbstung und Kreuzung mit *co hy* 2n besteht. In den Schoten der normalen Triebe von SG 5 werden nach einer Kreuzung mit *co hy* 2n etwa doppelt so viele Samen pro Schote ausgebildet. Der Samenansatz ist nach einer Kreuzung mit *co hy* 2n bei allen vergleichbaren semigamen Pflanzen zwar etwas höher als nach Selbstung, aber immer noch wesentlich unter der gewöhnlich ausgebildeten Anzahl von 50 Samen pro Schote. Demnach sind auch die Samenanlagen der semigamen Pflanzen nicht alle funktionsfähig.

5. Nachkommen der semigamen Pflanzen

Alle Nachkommen der semigamen Pflanzen zeigen wieder die *hy* Merkmale (Tab. 5). Ein großer Teil dieser Pflanzen stirbt vor dem Erreichen des Blühalters ab. Besonders unter denjenigen Pflanzen, die aus Selbstungen hervorgehen, finden sich häufig Kümmerformen. Diese Kümmerformen sind vermutlich aneuploide Pflanzen, die infolge der Meiosestörungen der semigamen Pflanzen entstehen könnten.

Tabelle 5. Nachkommen der semigamen Pflanzen

Kreuzungen	ausgelegte Samen	Spaltung En : <i>hy</i>	zur Blüte gelangt
SG 5 $\times$ <i>co hy</i> 2n	50	0 45	28
SG 5 Abweichertrieb selbst	5	0 4	3
SG 5 Abweichertrieb $\times$ <i>co hy</i> 2n	21	0 8	5
SG 6 selbst	50	0 47	29
SG 6 $\times$ <i>co hy</i> 2n	50	0 36	25
SG 8 $\times$ <i>co hy</i> 2n	36	0 19	8
SG 9 selbst	40	0 34	17
SG 9 $\times$ <i>co hy</i> 2n	50	0 46	27

Die Nachkommen der semigamen Pflanzen müßten alle auf Grund ihrer genetischen Konstitution *co* spät blühen. Ein Teil der Nachkommen blüht jedoch eher als die *co hy* Kontrollen (Abb. 17). Der Anteil an frühblühenden Nachkommen ist bei einzelnen semigamen Pflanzen unterschiedlich. Zum Beispiel blühen die Nachkommen von SG 8 alle eher als die Kontrollen, während un-

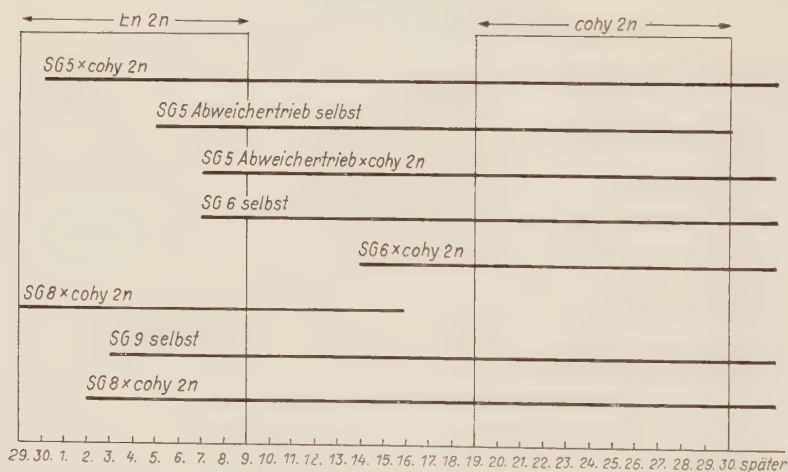


Abb. 17. Blühbeginn der Nachkommen semigamer Pflanzen sowie der En- und *co hy*-Kontrollen

gefähr die Hälfte der Nachkommen von SG 5 und SG 9 eher als die Kontrollen blühen. Im Gegensatz dazu blühen die meisten Nachkommen von SG 6 mit den Kontrollen auf, während SG 6 früher als die Kontrollen blühte. Die frühblühenden Pflanzen treten in annähernd gleicher Häufigkeit sowohl nach einer Selbstung als auch nach Kreuzung mit *co hy* auf.

Die Pollenfertilität der Nachkommen ist uneinheitlich. Neben den von Anfang an fertilen Pflanzen werden andere anfänglich sterile Pflanzen im Verlauf ihrer Blühperiode mehr oder weniger fertil. Wieder andere behalten während der

ganzen Zeit ihre verminderte Fertilität bei. Ein kleiner Teil ist steril. Vergleicht man die Fertilität der Nachkommen von den verschiedenen semigamen Pflanzen miteinander, so können auch hier Unterschiede festgestellt werden. Während die Nachkommen von SG 8 alle fertil sind, sind unter den Nachkommen der anderen semigamen Pflanzen sowohl fertile als auch sterile Pflanzen.

Zytologische Untersuchungen

Die Meiose verläuft bei allen semigamen Pflanzen aberrant. Die Chromosomenzahl einer Pflanze variiert von einer Pollenmutterzelle zur andern. Dies wird dadurch verursacht, daß sich einzelne Chromosomen in der Anaphase I, besonders aber in der Anaphase II teilen können. Die Ermittlung der Chromosomenzahl stößt deshalb bei diesen Pflanzen auf einige Schwierigkeiten.

SG 5 normaler Trieb

Werden die Chromosomen der Anaphase I gezählt, so kommt man zu einer Chromosomenzahl, die zwischen 10 und 12 liegt. In der Metaphase II können sowohl 5–5 als auch 6–5 Verteilungen beobachtet werden. Die meisten Unregelmäßigkeiten treten in der Anaphase II auf. Während einzelne Chromosomen außerhalb der Teilungsspindel liegen (Abb. 18), lassen andere in der Anaphase II deutlich einen Teilungsspalt erkennen (Abb. 19, 20). In den Pollenmutterzellen,



Abb. 18



Abb. 19



Abb. 20

Abb. 18. SG 5 normaler Trieb. Anaphase II. 2 Chromosomen liegen außerhalb der Teilungsspindeln

Abb. 19. SG 5 normaler Trieb. Anaphase II. Zusätzliche Teilung von mindestens einem Chromosom

Abb. 20. SG 5 normaler Trieb. Anaphase II. Zusätzliche Teilung einiger Chromosomen

deren Meiose weniger gestört ist, können in der Anaphase II folgende Chromosomenverteilungen beobachtet werden: 4–4 4–4 +2 Chromosomen außerhalb der Teilungsspindel; 6–6 5–?; 5–5 5–5?; 4–4 6?–6?; 6–6 5–?. Die Tetradenbildung verläuft normal. Im Laufe der weiteren Entwicklung degeneriert der größte Teil der Pollenkörner. Die lebenden Pollenkörner sind fast nur dreiporig, seltener vier- oder zweiporig. Die Auszählung von zwei Pollenkornmitosen ergab 1×5 und 1×6 oder 7 Chromosomen.

SG 5 Abweichertrieb

In den wenigen Pollenmutterzellen sind keine auswertbaren Stadien vorhanden. Die Meiose scheint aber hier mindestens genau so aberrant zu verlaufen wie in den Knospen der normalen Triebe. Dies zeigt zum Beispiel Abbildung 21. In einer Pollenmutterzelle, in der die meiotischen Teilungen beendet und die Zyto-



Abb. 21. SG 5 Abweichertrieb. In einer Pollenmutterzelle, die schon die Meiose beendet hat, liegen einzelne Chromosomen im Zytoplasma zerstreut

kinesen noch nicht erfolgt sind, liegen im Zytoplasma zerstreut 5 Chromosomen. Die Auszählung zweier Pollenkornmitosen ergab beide Male 5 oder 6 Chromosomen.

Die Chromosomenzahl von SG 5 dürfte 10 sein, zumal die Auszählungen der Anaphase II eher zugunsten von 10 Chromosomen als zugunsten von 11 sprechen. Für eine 10chromosomige Pflanze spricht auch das Fehlen von trisomen Merkmalen (STEINITZ-SEARS 1963). Das gelegentliche Vorkommen von 2porigen und 4porigen Pollenkörnern kann auf die in der Meiose beobachteten Störungen zurückgeführt werden, wobei die 2porigen Pollenkörner weniger, die 4porigen mehr als 5 Chromosomen enthalten würden. Ab welcher Chromosomenzahl 2- bzw. 4porige Pollenkörner gebildet werden, wurde nicht untersucht.

SG 6

In der Anaphase I können 10 und 11 Chromosomen gezählt werden. Wenn sich die Chromosomen in der Anaphase I vorzeitig teilen, gelangt man zu der in Abbildung 22 gezeichneten Figur, die nicht ausgewertet werden kann. In der Metaphase II werden folgende Chromosomenverteilungen festgestellt: 5?-5; 6 oder 7-4?; 5?-6?; 4-6 oder 8. Von allen semigamen Pflanzen sind die Meioseanomalien in der Anaphase II bei SG 6 am stärksten ausgeprägt. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen Anaphasechromosomen, die sich in der Anaphase II entweder schon ge-



Abb. 22



Abb. 23



Abb. 24

Abb. 22. SG 6. Nicht auswertbare Anaphase I

Abb. 23. SG 6 Anaphase II. Zusätzliche Teilung einiger Chromosomen

Abb. 24. SG 6 Anaphase II. Zusätzliche Teilung einiger Chromosomen

teilt haben oder erst einen Teilungsspalt zeigen. Die Teilungsprodukte, die dicht beieinander liegen, sind kleiner und deutlich von den normalen Chromosomen zu unterscheiden. Einige der Pollenmutterzellen zeigen eine weitere Abnormalität: zwischen den Anaphasechromosomen, von denen einige vor einer Teilung stehen, liegen kleine pulverförmige Chromosomenbruchstücke (Abb. 25). In den Pollen-



Abb. 25. SG 6. Anaphase II mit Chromosomenbruchstücken

mutterzellen, die keine so erheblichen Meiosestörungen zeigen, können in der Anaphase II folgende Chromosomenanordnungen festgestellt werden 7-7 4-4; 4-4 8-8; 5-5 5-5?; 5-5 6-6?; 5-5 11 insgesamt; 5-5 5-6?. Die Tetraden werden auch hier normal ausgebildet. Der größte Teil der Pollenkörner degeneriert, die wenigen lebenden Pollenkörner sind meistens 3porig, ganz selten 4porig. Anhand einiger Pollenkornmitosen konnten folgende Chromosomenzahlen ermittelt werden: 3×5 , 1×5 oder 6 , 4×6 , 1×7 ?

Bei SG 6 sind 10 Chromosomen genauso möglich wie 11 Chromosomen. Nachdem aber auch hier keine Merkmale trisomer Pflanzen beobachtet werden und man außerdem bei der Auszählung der aberranten Meiosen eher zu höheren als zu niedrigeren Chromosomenzahlen kommt, ist es wahrscheinlicher, daß SG 6 eine 10 chromosomige, also diploide Pflanze ist.

SG 8

Auch bei dieser Pflanze ist die Auszählung der Meiose durch kleine Chromosomen beeinträchtigt. In den wenigen Pollenmutterzellen wird in der Metaphase II eine 7?-2? Verteilung, in einer Anaphase II auf der einen Seite eine 4-4 Verteilung festgestellt, während 6 oder 7 Chromosomen noch in der Metaphase II sind und sich vermutlich noch nicht geteilt haben. Klarheit brachte die Auszählung einer somatischen Mitose, die eindeutig 10 Chromosomen ergab. Wie bei den anderen semigamen Pflanzen werden zunächst normale Tetraden gebildet. Der größte Teil der Pollenkörner degeneriert im Laufe der weiteren Entwicklung. Die wenigen lebenden Pollenkörner sind praktisch alle 3porig, ganz vereinzelt 4porig.

SG 9

Die Chromosomenzahl dieser Pflanze kann nicht festgestellt werden. Während in der Anaphase I 13 oder 14 Chromosomen gezählt werden, konnten in der Meta-

phase II folgende Verteilungen beobachtet werden: 9–10 oder 8; 11 oder 10–10; 5 oder 6–5 oder 6; 6?–9. Pollenmutterzellen in der Anaphase II lagen nicht vor. Die Auszählung der Mitosen ergibt 10, 11, 12 oder 13 Chromosomen, die der Pollenkornmitosen 3×5 , 2×6 , 1×6 oder 7 Chromosomen. Die Pollenkörner sind zum größten Teil degeneriert. Die lebenden Pollenkörner sind 3- oder 4porig, seltener 2porig. Die Chromosomenzahl von SG 9 liegt zwischen 10 und 14.

Die Chromosomenzahl von drei der vier vatergleichen Pflanzen, welche die Nachkommen einer Pflanze sind, ist ziemlich sicher 10. Dies ist in einer $2n \times 4n$ Kreuzung im Falle einer Semigamie zu erwarten. Von 5 Geschwistern dieser 3 semigamen Pflanzen haben 4 die zu erwartende Chromosomenzahl 15, 1 Geschwister dagegen 10 Chromosomen. Die Meiose der Geschwister der semigamen Pflanzen verlief ohne Störungen. Die 10chromosomige Pflanze ist grün und auch in den anderen Merkmalen mit der Enkheimer Rasse identisch. Von 300 ausgelegten Samen der geselbsteten Pflanze keimten 299. Die Keimlinge sind alle wieder mit der Enkheimer Rasse identisch. Diese 10chromosomige Pflanze kann sowohl durch eine Semigamie als auch durch eine Parthenogenese entstanden sein. Im Falle einer Semigamie liegen die ♂ Kerne entweder im Suspensor oder in den Bezirken des Embryos, aus denen später die Wurzel gebildet wird. Die Verdopplung des haploiden Chromosomensatzes wäre sowohl bei einer Semigamie als auch im Falle einer Parthenogenese durch Autogamie zu erklären.

Der vermutlich höhere Ploidiegrad von SG 9 kann auf eine aneuploide Gone, die mehr als 10chromosomig war, zurückgeführt werden. In der Meiose der tetraploiden *Arabidopsis* werden die Chromosomen in der Anaphase I nicht immer gleichmäßig verteilt; so kommen neben der 10–10 Verteilung 9–11 Verteilungen vor. Angenommen, die 11- und die 9chromosomigen Gonen wären in beiden Geschlechtern gleichermaßen funktionsfähig, dann müßten in der nachfolgenden Generation außer 20chromosomigen Pflanzen solche mit 18, 19, 21 und 22 Chromosomen entstehen. Die zu den Kreuzungen verwendeten *co hy* Pflanzen konnten sowohl wegen der großen Anzahl, die benötigt wurde, als auch infolge der relativ kurzen Blühperiode nicht vor der Kreuzung zytologisch untersucht werden. Die Eltern der verwendeten Pflanzen waren jedoch alle 10chromosomig. Es ist deshalb möglich, daß auch Pollen einer 18-, 19-, 21- oder 22chromosomigen Pflanze zur Bestäubung verwendet wurde. SG 9 kann auf eine aneuploide Gone, die in der Meiose dieser polyploiden Pflanzen entstehen kann, zurückgeführt werden.

Diskussion

Eine Degeneration des Eizellkerns konnte mit den angewandten Dosen innerhalb der Zeit, in der eine Bestäubung möglich ist, nicht erreicht werden. Eine androgenetische Entwicklung ist deshalb ausgeschlossen. Dagegen bleibt die Karyogamie zwischen Eizellkern und Spermakern gelegentlich aus und die beiden nicht verschmolzenen Kerne teilen sich = Semigamie. Die Kerne im Embryo sind teils väterlichen, teils mütterlichen Ursprungs. Damit konnte erstmals eine Semi-

gamie experimentell induziert werden. Es besteht dabei weder eine Dosisabhängigkeit, noch ist ein Einfluß der Bestäubungszeit auf die Induktion einer Semigamie festzustellen.

Ionisierende Strahlen scheinen allgemein eine Kernfusion verhindern zu können. So waren beispielsweise die 2 Polkerne nach der Bestrahlung mit den höchsten Dosen 2 Tage nach der Bestäubung verschiedentlich noch nicht verschmolzen, während dies im allgemeinen zur Zeit der Bestäubung der Fall ist. Auch nach einer Pollenbestrahlung kann die Karyogamie zwischen ♀ und ♂ Kern unterbleiben (VASSILEVA-DRYANOVSKA 1966, NISHIYAMA 1967). Der Mechanismus, der die Fusion von 2 Kernen nach einer Bestrahlung verhindert, ist genauso unbekannt wie derjenige, der normalerweise eine Kernfusion bewirkt.

Neben dem histologischen Nachweis einer Semigamie gelang erstmals an 4 Pflanzen auch der genetische Nachweis. Hierbei erwies sich das pleiotrope Gen *hy* als sehr vorteilhaft. Neben den 2 Pflanzen, die nur väterliche Merkmale zeigten, konnte der genetische Beweis für eine Semigamie durch die 2 Pflanzen erbracht werden, die Chimären waren, also väterliche und mütterliche Merkmale in einer Pflanze vereinigten. Im Gegensatz zu der in den histologischen Präparaten beobachteten Semigamie waren in den genetischen Untersuchungen alle 4 semigamen Pflanzen Nachkommen von $2n \times 4n$ Kreuzungen, bei denen die Fruchtknoten mit 4 kR bestrahlt worden waren. Ob eine Dosisabhängigkeit besteht, kann wegen der geringen Anzahl der semigamen Pflanzen nicht entschieden werden. Weshalb in den $2n \times 2n$ und in den $4n \times 2n$ Kreuzungen keine semigamen Pflanzen aufgetreten sind, könnte auf einer geringeren Überlebenschance eines haploiden Embryos beruhen. Ungeklärt bleibt dann jedoch, warum in den $4n \times 4n$ Kreuzungen keine Semigamie induziert wurde.

Die zytologischen Untersuchungen ergaben einen weiteren Beweis für eine Semigamie. Von den 4 semigamen Pflanzen waren drei mit großer Wahrscheinlichkeit 10chromosomig, eine Pflanze hatte durch eine aneuploide Gone mehr als 10 Chromosomen. Die in einer $2n \times 4n$ Kreuzung bei *Arabidopsis thaliana* zu erwartende Chromosomenzahl 15 konnte bei den Geschwistern der semigamen Pflanzen bis auf eine Ausnahme festgestellt werden. Die 10chromosomige Pflanze mit mütterlichen Merkmalen ist entweder durch eine Semigamie oder durch eine Parthenogenese entstanden. Auch die Tatsache, daß die Nachkommen der semigamen Pflanzen wieder die *hy* Merkmale zeigten, kann als weiterer Beweis gelten.

Die semigamen Pflanzen, die bezüglich des Gens *hy* mit der *co hy* Mutante ganz oder teilweise identisch sind, weisen einige Besonderheiten auf. Hier sind zunächst die morphologischen Abnormitäten von SG 5 zu nennen: 2 Rosetten, 2 Haupttriebe, die Abweichtertriebe und die Blütenanomalien, die nur an den Abweichtertrieben beobachtet werden. Nachdem die Chromosomen von SG 5 unbestrahlt, das Zytoplasma dagegen bestrahlt war, kann für diese Abnormitäten ein Einfluß des bestrahlten Zytoplasmas nicht ausgeschlossen werden.

Eine weitere Eigentümlichkeit ist der frühe Blühtermin von SG 6, der jedoch in der Nachkommenschaft von SG 6 wieder weitgehend dem der *co hy* Mutante entspricht. Im Gegensatz dazu blühen die Nachkommen von SG 8 alle, die von

SG 5 und SG 9 zur Hälfte vor den Kontrollen, während der Blühtermin von SG 5, SG 8 und SG 9 wegen ihrer verspäteten Keimung nicht mit den Kontrollen verglichen werden konnte. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, daß Pflanzen, die aus einer Samen- oder Keimlingsbestrahlung hervorgehen, früher als die Kontrollen blühen (REINHOLZ 1945, SAMUEL und KAMRA 1968). Auch nach einer Fruchtknotenbestrahlung von *Arabidopsis thaliana* war der Blühtermin nicht semigamer Pflanzen deutlich vorverlegt. Die Blühstimulation der semigamen Pflanzen, deren Chromosomen unbestrahlt sind, kann deshalb nur über das bestrahlte Zytoplasma erfolgt sein.

Ob die hochgradige Sterilität in beiden Geschlechtern der semigamen Pflanzen, die sich in unterschiedlicher Weise auf die Nachkommen überträgt, auf den Meiosestörungen der semigamen Pflanzen beruht, läßt sich nicht entscheiden. Ebenso kann in der Nachkommenschaft der semigamen Pflanzen das Fertilitätswerden anfangs steriler Pflanzen schwer erklärt werden. Zwar wird Pollensterilität häufig durch chromosomale Störungen hervorgerufen. Im vorliegenden Fall dürfte das jedoch kaum zutreffen, weil keine Unterschiede zwischen den Nachkommen von Selbstungs- und Kreuzungsserien vorhanden sind. Eine durch Umweltbedingungen verursachte Sterilität kann ebenfalls ausgeschieden werden, da sterile Pflanzen sowohl unter den frühblühenden als auch unter den spätblühenden zu finden sind.

Die Meiosestörungen ihrerseits können aber auf keinen Fall auf eine direkte Strahlenschädigung der Chromosomen zurückgeführt werden. Die Möglichkeit, daß die Gene *co hy* der Rasse Columbia im Plasma der Enkheimer Rasse die Meiosestörungen verursachen würden, kann mit Sicherheit ausgeschieden werden, weil die *co hy* Pflanzen der F_2 aus einer $En(2n) \times co\ hy(2n)$ Kreuzung voll fertil waren. Vielmehr muß auch hier ein zytoplasmatischer Einfluß vorliegen; entweder in der Art, daß eine Schädigung der Chromosomen über das bestrahlte Zytoplasma erfolgt ist, oder daß zumindest einige zytoplasmatische Erbräger mutativ verändert wurden.

Zusammenfassung

Nach einer Fruchtknotenbestrahlung von *Arabidopsis thaliana* und nachfolgender Bestäubung mit unbestrahltem Pollen konnte erstmals eine Semigamie induziert werden. Die Beweise für eine Semigamie konnten erstens durch die histologischen Untersuchungen erbracht werden. Zweitens wurde durch den geeigneten Marker *hy* der Mutante *co hy* eine Semigamie erstmals auch genetisch nachgewiesen. Drittens zeigten alle Nachkommen der semigamen Pflanzen wieder die *hy* Merkmale. Die zytologischen Untersuchungen ergaben die bei einer Semigamie zu erwartenden Chromosomenzahlen und sind somit ein weiterer Beweis.

Die semigamen Pflanzen weisen aber trotz ihrer Identität mit dem *hy* Merkmal einige Abnormitäten auf. Dies sind die morphologischen Abnormitäten von SG 5, die Sterilität, die Verschiebung des Blühtermins und die Meioseanomalien. Auch ein Teil der Nachkommen zeigte Anomalien. Diese Anomalien können nicht durch einen unbestrahlten Kern verursacht werden. Es muß daher an-

genommen werden, daß das bestrahlte Zytoplasma einen Einfluß auf die Ausprägung dieser Anomalien hat.

Herrn Prof. Dr. C. G. ARNOLD danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für die stete Unterstützung bei ihrer Durchführung. Herrn Prof. Dr. W. HAUPT und Herrn Prof. Dr. E. KESSLER danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Summary

Induction of Semigamy in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Semigamy was induced for the first time experimentally by irradiating the ovules of *Arabidopsis thaliana* and pollinating the stigmas with untreated pollen. Evidence for semigamy was proved first of all genetically by the marker *hy* of the mutant *co hy*. All progeny of semigamic plants showed the typical *hy* – signs again. The next proof was furnished by the study of histological slides. Finally, cytological investigations yielded exactly the same numbers of chromosomes which should be expected after semigamy.

In spite of their identity concerning the *hy* marker, there are some abnormalities among the semigamic plants. These are the morphologic irregularities in SG 5, sterility, changing in the outset of flowering and disturbances during meiosis. There are abnormalities even in some of the progeny of semigamic plants. These abnormalities can not be caused by the not irradiated nucleus. Therefore, there must be some influence of the irradiated cytoplasm.

Schriftenverzeichnis

- ARNOLD, C. G., und D. CRUSE, 1968, Herstellung von Totalpräparaten zur Darstellung von Embryonen. Arabid. Inf. Serv. 5: 58.
- BATTAGLIA, E., 1945, Fenomeni citologici nuovi nella embriogenesi (semigamia) e nella microsporogenesi (doppio nucleo di restituzione) di *Rudbeckia laciniata* L. Nuovo Giorn. bot. Ital. 52: 34–38.
- , 1946, Ricerche cariologiche e embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). VIII. Semigamia in *Rudbeckia laciniata* L. Nuovo Giorn. bot. Ital. 53: 483–511.
- , 1947a, Ricerche cariologiche e embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). XI. Semigamia in *Rudbeckia speciosa* Wender. Nuovo Giorn. bot. Ital. 54: 531–559.
- , 1947b, La „Semigamia“ singolare comportamento del nucleo spermatico nelle uova diploidi delle specie apomittiche del genere *Rudbeckia* (Asteraceae) e conseguente embriogenesi di tipo chimerico. R. C. Acad. Lincei 8: 63–67.
- , 1954, Semigamie chez *Rudbeckia sullivantii* Boynton et Beadle (Compositae). Proc. 8th Internat. Bot. Congr. (Paris) Sec. 7–8: 245–247.
- , 1955, Unusual cytological features in the apomictic *Rudbeckia sullivantii* Boynton et Beadle. Caryologia 8: 1–32.
- , 1963, Apomixis. In: P. MAHESHWARI, Recent advances in the embryology of Angiosperms. Delhi.
- CLAUSEN, R. E., and W. E. LAMMERTS, 1929, Interspecific hybridization in *Nicotiana*. Haploid and diploid merogony. Americ. Naturalist 63: 279–382.
- COE, G. E., 1953, Cytology of reproduction in *Cooperia pedunculata*. Amer. J. Bot. 40: 335–343.
- CONN, H. J., M. A. DARROW, and V. M. EMMEL, 1962, Staining Procedures. Baltimore.

- DURYEE, W. R., 1949, The nature of radiation injury to *amphibian* cell nuclei. J. Nat. Cancer Inst. 10: 735–795.
- EHRENSBERGER, R., 1948, Versuche zur Auslösung von Haploidie bei Blütenpflanzen. Biol. Zbl. 67: 537–546.
- GEITLER, L., 1949, Schnellmethoden der Kern- und Chromosomen-Untersuchung. Wien.
- GERASSIMOVA, H., 1936, Experimentell erhaltene haploide Pflanze von *Crepis tectorum* L. Planta 25: 696–702.
- GERLACH, D., 1965, Befruchtung und Autogamie bei *Rubus caesius*. Biol. Zbl. 84: 611–633.
- GERLACH-CRUSE, D., 1969, Embryo- und Endospermentwicklung nach einer Röntgenbestrahlung der Fruchtknoten von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Radiation Botany 9: 433–442.
- HAUSTEIN, E., 1961, Eine androgene haploide *Oenothera scabra*. Planta 56: 457–478.
- LAIBACH, F., 1907, Zur Frage der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich. Beih. z. Bot. Zentralbl. 22: 191–210.
- NISHIYAMA, I., and S. UEMATSU, 1967, Radiobiological studies in Plants. Embryogenesis following X – irradiation of pollen in *Lycopersicum pimpinellifolium*. Radiation Botany 7: 481–489.
- ORD, M. J., and J. F. DANIELLI, 1956, The site of damage in *Amoebae* exposed to X – rays. Quart. J. Microscop. Sci. 97: 29–37.
- REINHOLZ, E., 1945, Auslösung von Röntgenmutationen bei *Arabidopsis thal.* (L.) Heynh. und ihre Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und Evolutionstheorie. Diss. Frankfurt a/M.
- ROMEIS, B., 1948, Mikroskopische Technik. München.
- SAMUEL, J., and O. P. KAMRA, 1968, On radiostimulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*. Arabid. Inf. Serv. 5: 31–32.
- STEFFEN, K., 1963, Fertilization. In: P. MAHESHWARI, Recent advances in the embryology of Angiosperms. Delhi.
- STEINITZ-SEARS, L. M., 1963, Chromosome Studies in *Arabidopsis thal.* Genetics 48: 483–489.
- ULRICH, H., 1956, Die Strahlenempfindlichkeit von Zellkern und Plasma und die indirekte mutagene Wirkung der Strahlen. Verh. dtsch. Zool. Ges. Hamburg 150–182.
- VASSILEVA-DRYANOVSKA, O. A., 1966, Development of embryo and endosperm produced after irradiation of pollen in *Tradescantia*. Hereditas 55: 129–148.
- WHITING, A. R., 1948, Incidence and origin of androgenetic males in x-rayed *Habrobracon* eggs. Biol. Bull. 95: 354–360.

Anschrift des Verfassers: Frau Dr. D. GERLACH-CRUSE, Botanisches Institut der Universität Erlangen–Nürnberg, 852 Erlangen, Schloßgarten 4.

L e b e n s l a u f

Am 29. November 1935 wurde ich, Doris Gerlach geb. Cruse, als Tochter des Kaufmanns Hermann Cruse und dessen Ehefrau Elfriede geb. Binswanger in Stuttgart geboren. Die Grundschule besuchte ich von 1942 - 1947 nacheinander in Stuttgart - Zuffenhausen, Neuenbürg (Schwarzwald), Fleischwangen Kreis Saulgau und Stuttgart - Zuffenhausen. Von 1947 - 1953 besuchte ich zunächst die Oberschule für Mädchen in Stuttgart - Feuerbach, dann von 1953 - 1956 das Mörike - Gymnasium in Stuttgart, an dem ich 1956 die Reifeprüfung ablegte. In den Jahren 1957 - 1959 war ich als Apothekerpraktikantin in der Stadtapotheke in Böblingen tätig. 1959 legte ich das Pharmazeutische Vorexamen ab. Nachdem ich vom SS 59 bis zum SS 61 an der Universität Erlangen - Nürnberg zunächst Pharmazie studiert habe, begann ich im WS 61/62 mit dem Studium der Biologie, das ich am 27. 11. 1968 mit der Promotion abschloß.

